

Trabajo de tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Químicas:

*DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE
NUEVOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE
FÁRMACOS*

Tesis Doctoral

Farmacéutica Renée Onnainty

- 2016 -

Trabajo de Tesis Doctoral realizado en:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Gladys Ester Granero

COMISIÓN DE TESIS:

Dra. Marcela Raquel Longhi

Dra. Cecilia Álvarez Igarzábal

Dra. Lidia Mabel Yudi

EVALUADOR EXTERNO:

Dr. Julio Alberto Luna

Facultad de Ingeniería Química - UNL -

A mis viejos, Graciela y Raúl

En estas sencillas palabras me gustaría agradecerles a todas las personas que me acompañaron en estos años y que hicieron posible realizar este trabajo de tesis:

A **Gladys**, por su confianza en mí para desarrollar este trabajo y por apoyarme en cada nuevo proyecto.

A la comisión de tesis, **Dra. Longhi, Yudi y Álvarez**, por sus aportes a lo largo de todos estos años, y al **Dr. Luna**, por aceptar evaluar esta tesis doctoral.

A la gente de los departamentos de **Farmacia, Orgánica, Físicoquímica y Bioquímica** por brindarme su ayuda cada vez que la solicité.

Al **Dr. Alfredo Quevedo** y a las **Dras. Mariana Fernández y Paulina Paéz**, por su tiempo y dedicación a los trabajos realizados en colaboración.

A los Profesores **Barresi, Fissore y Onida**, y a toda la gente que conocí en el Politécnico de Torino, por brindarme toda su hospitalidad durante mi estadía en Italia.

A mis compañeras de laboratorio 204-205: **Julia, Romi, Juli, Vane, Caro, Jime, Noel, Cinthia, Ari, Clau, Dra. Longhi y Dra. Ortiz**; a los chicos del 202: **Sole, Sergio y Freddy**; y los chicos del box: **Flavia, Diego y Octavio**... a todos ellos, gracias por los momentos compartidos, académicos y no tanto, que hacen del día a día, momentos inolvidables.

A **mis amigos**, los de ayer, hoy y siempre... por acompañarme incondicionalmente, brindándome siempre lo mejor.

A mi familia, a quienes amo inmensamente: mis viejos, **Graciela y Raúl**, por apoyarme siempre en cada nueva iniciativa, por ser mis guías y mis maestros, que me enseñaron que con esfuerzo y convicción todo es posible; a mis hermanitos, **Nacho y Euge**, por el aguante, por su alegría y por estar siempre a mi lado.

A mis cuñadas **Flor y Loli**, por todos los hermosos momentos compartidos.

A mi familia del sur, **Marita, Lali, Juan Cruz, Juanchi y Mari**, por estar siempre presentes a pesar de la distancia.

A **mis tios/as, primos/as y abuelas**, por siempre estar pendientes de mí.

Al amor de mi vida, mi novio, mi mejor amigo y compañero de trabajo, **Esteban**, un millón de gracias y más, por ser tan incondicional conmigo, por estar siempre a mi lado, por ser mi cable a tierra, por confiar tanto en mí, por apoyarme en todo sin dudar, y por sobre todo, por tu infinita paciencia....gracias por compartir este camino conmigo, y por hacer que las cosas sean simples a tu lado... Te amo!



ÍNDICE

| | |
|--------------|-----|
| Abreviaturas | I |
| Objetivos | VII |
| Resumen | IX |

Capítulo 1:

Introducción

| | |
|--------------------------------------|----|
| ➤ Sistemas de Liberación de Fármacos | 1 |
| ➤ Vías de Administración | 2 |
| ➤ Ciclodextrinas | 5 |
| ➤ Nanopartículas poliméricas | 6 |
| ➤ Bionanocompuestos | 8 |
| ➤ Montmorillonita | 9 |
| ➤ Quitosano | 11 |
| ➤ Formulaciones Mucoadhesivas | 13 |
| ➤ Bioadhesión | 14 |
| • <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 17 |

Capítulo 2:

Desarrollo y Caracterización de Complejos de Inclusión

| | |
|--|----|
| • <u>INTRODUCCIÓN</u> | 21 |
| ➤ Ciclodextrinas | 22 |
| ➤ Hidroclorotiazida | 25 |
| ➤ Sistema de Clasificación Biofarmacéutico | 26 |
| ➤ Objetivos | 27 |
| ➤ Materiales | 29 |

| | |
|--|----|
| • Parte I: <u>CARACTERIZACIÓN EN SOLUCIÓN</u> | 31 |
| 2.1.1 Instrumental | 31 |
| 2.1.2 Métodos | 31 |
| 2.1.2.1 Diagrama de Solubilidad de Fases | 31 |
| 2.1.2.2 Titulación Isotérmica Calorimétrica | 32 |
| 2.1.2.3 Resonancia Magnética Nuclear | 33 |
| 2.1.2.4 Análisis Estadístico de los Datos | 34 |
| 2.1.3 Resultados y Discusión | 34 |
| 2.1.3.1 Diagrama de Solubilidad de Fases | 34 |
| 2.1.3.2 Titulación Isotérmica Calorimétrica | 40 |
| 2.1.3.3 Resonancia Magnética Nuclear | 45 |
| 2.1.3.4 Análisis Estadístico de los Datos | 51 |
| 2.1.4 Discusión Final de Resultados y Conclusiones Parciales | 53 |
| • Parte II: <u>CARACTERIZACIÓN EN ESTADO SÓLIDO</u> | 55 |
| 2.2.1 Instrumental | 55 |
| 2.2.2 Preparación de Muestras | 55 |
| 2.2.2.1 Mezcla Física | 55 |
| 2.2.2.2 Liofilizado | 55 |
| 2.2.3 Métodos | 56 |
| 2.2.3.1 Análisis térmico: DSC/TGA | 56 |
| 2.2.3.2 Espectroscopía Infrarroja | 56 |
| 2.2.3.3 Ensayos de Disolución | 57 |
| 2.2.4 Resultados y Discusión | 58 |
| 2.2.4.1 Análisis térmico: DSC y TGA | 58 |

| | |
|--|----|
| 2.2.4.2 Espectroscopía Infrarroja | 61 |
| 2.2.4.3 Ensayos de Disolución | 63 |
| 2.2.5 Discusión Final de Resultados y Conclusiones Parciales | 66 |
| • Parte III: <u>ESTUDIOS COMPUTACIONALES</u> | 67 |
| 2.3.1 Metodología Aplicada de Modelado Molecular | 67 |
| 2.3.2 Resultados de los Estudios de Modelado Molecular | 69 |
| 2.3.2.1 Estudios de <i>Docking</i> | 69 |
| 2.3.2.2 Estudios de Dinámica Molecular | 72 |
| 2.3.2.3 Afinidad en Función de la Temperatura | 76 |
| 2.3.3 Discusión Final de Resultados y Conclusiones Parciales | 79 |
| • <u>RESUMEN FINAL Y CONCLUSIONES GENERALES</u> | 81 |
| • <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 83 |

Capítulo 3:

Desarrollo, Caracterización y Evaluación de Nanopartículas Poliméricas

| | |
|-----------------------|----|
| • <u>INTRODUCCIÓN</u> | 87 |
| ➤ Nanopartículas | 88 |
| ➤ Quitosano | 90 |
| ➤ Objetivos | 92 |
| ➤ Materiales | 94 |

| | |
|--|------|
| • Parte I: <u>SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA</u> | 95 |
| 3.1.1 Instrumental | 95 |
| 3.1.2 Métodos | 95 |
| 3.1.2.1 Obtención de Nanopartículas | 95 |
| 3.1.2.2 Inclusión del Complejo a las Nanopartículas | 97 |
| 3.1.2.3 Determinación de Tamaño y del Potencial Z | 98 |
| 3.1.2.4 Estudios de Estabilidad | 99 |
| 3.1.2.5 Microscopía Electrónica de Barrido | 99 |
| 3.1.2.6 Estudios de Liberación <i>in vitro</i> | 100 |
| 3.1.3 Resultados | 101 |
| 3.1.3.1 Obtención de las Nanopartículas | 101 |
| 3.1.3.2 Eficiencia de Encapsulación | 102 |
| 3.1.3.3 Determinación de Tamaño y del Potencial Z | 103 |
| 3.1.3.4 Estudios de Estabilidad | 105 |
| 3.1.3.5 Microscopía Electrónica de Barrido | 107 |
| 3.1.3.6 Estudios de Liberación <i>in vitro</i> | 110 |
| 3.1.4 Discusión | 111 |
| 3.1.5 Conclusiones Parciales | 112 |
| • Parte II: <u>ESTUDIOS BIOFARMACÉUTICOS</u> | 113 |
| 3.2.1 Instrumental | 113 |
| 3.2.2 Métodos | 1114 |
| 3.2.2.1 Estudios de Mucoadhesión | 114 |
| 3.2.2.1.1 Determinación por Potencial Z | 114 |
| 3.2.2.1.2 Determinación por SEM | 114 |
| 3.2.2.2 Estudios de Permeabilidad Intestinal <i>in vitro</i> | 115 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.2.3 Estudios de Viabilidad Intestinal | 116 |
| 3.2.2.4 Técnica Bioanalítica | 117 |
| 3.2.2.4.1 Extracción en Fase Sólida | 117 |
| 3.2.2.4.2 Validación de la Técnica Cromatográfica | 118 |
| 3.2.2.4.3 Estudios de Estabilidad | 119 |
| 3.2.2.5 Análisis de los Datos | 119 |
| 3.2.2.6 Análisis Estadístico de los Datos | 119 |
| 3.2.2.7 Estudios de Toxicidad Intestinal | 120 |
| 3.2.3 Resultados | 121 |
| 3.2.3.1 Estudios de Mucoadhesión | 121 |
| 3.2.3.1.1 Determinación por Potencial Z | 122 |
| 3.2.3.1.2 Determinación por SEM | 123 |
| 3.2.3.2 Estudios de Viabilidad Intestinal | 126 |
| 3.2.3.3 Técnica Bioanalítica | 127 |
| 3.2.3.3.1 Extracción en Fase Sólida | 127 |
| 3.2.3.3.2 Validación de la Técnica Cromatográfica | 128 |
| 3.2.3.3.3 Estudios de Estabilidad | 133 |
| 3.2.3.4 Análisis de los Datos | 133 |
| 3.2.3.5 Estudios de Toxicidad Intestinal | 141 |
| 3.2.4 Discusión | 148 |
| 3.2.5 Conclusiones Parciales | 153 |
| • <u>RESUMEN FINAL Y CONCLUSIONES GENERALES</u> | 155 |
| • <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 157 |

Capítulo 4:

Desarrollo y Caracterización de Bionanocompuestos

| | |
|---|-----|
| • <u>INTRODUCCIÓN</u> | 161 |
| ➤ Mucosa Oral | 162 |
| ➤ Bionanocompuestos | 163 |
| ➤ Quitosano | 163 |
| ➤ Montmorillonita | 164 |
| ➤ Clorhexidina | 164 |
| ➤ Objetivos | 165 |
| • <u>DESARROLLO EXPERIMENTAL</u> | 167 |
| 4.1 Materiales | 167 |
| 4.2 Instrumental | 167 |
| 4.3 Métodos | 168 |
| 4.3.1 Obtención de los Bionanocompuestos | 168 |
| 4.3.2 Eficiencia de Asociación y de Carga de la CLX | 169 |
| 4.3.3 Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X | 169 |
| 4.3.4 Espectroscopía Infrarroja | 170 |
| 4.3.5 Espectroscopía de Difracción de Rayos X | 170 |
| 4.3.6 Análisis Térmico: DSC/TGA | 171 |
| 4.3.7 Microscopía Electrónica de Barrido | 171 |
| 4.3.7.1 Morfología | 171 |
| 4.3.7.2 Estudios de Mucoadhesión | 171 |
| 4.3.8 Estudios de Liberación <i>in vitro</i> | 172 |
| 4.3.9 Estudios Microbiológicos <i>in vitro</i> | 173 |
| 4.3.10 Análisis Estadístico de los Datos | 174 |

| | |
|---|-----|
| 4.4 Resultados y Discusión | 174 |
| 4.4.1 Obtención de los Bionanocompuestos | 174 |
| 4.4.2 Eficiencia de Asociación y de Carga de la CLX | 175 |
| 4.4.3 Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X | 176 |
| 4.4.4 Espectroscopía Infrarroja | 178 |
| 4.4.5 Espectroscopía de Difracción de Rayos X | 182 |
| 4.4.6 Análisis Térmico: DSC/TGA | 185 |
| 4.4.7 Microscopía Electrónica de Barrido | 188 |
| 4.4.7.1 Morfología | 188 |
| 4.4.7.2 Estudios de Mucoadhesión | 189 |
| 4.4.8 Estudios de Liberación <i>in vitro</i> | 192 |
| 4.4.9 Estudios Microbiológicos <i>in vitro</i> | 198 |
| • <u>RESUMEN FINAL Y CONCLUSIONES GENERALES</u> | 200 |
| • <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 203 |

Capítulo 5:

Conclusiones y Proyecciones

| | |
|-----------------------|-----|
| • <u>CONCLUSIONES</u> | 207 |
| • <u>PROYECCIONES</u> | 211 |
| • <u>ANEXO</u> | 213 |

ABREVIATURAS

% v/v: Porcentaje Volumen en Volumen

ΔG° : Energía libre de Gibbs

ΔH : Cambio de Entalpía

ΔS : Cambio de Entropía

β CD: beta-ciclodextrina

δ : Corrimiento Químico

δ_{ac} : Corrimiento Químico del fármaco acomplexado

δ_{libre} : Corrimiento Químico del fármaco libre

$\Delta\delta$: Desplazamiento Químico

λ : Longitud de Onda

μ L: Microlitros

μ m: Micrómetros

^1H NMR: Resonancia Magnética Nuclear de Protones

ν : Estiramiento

$^\circ$: Grados

$^\circ\text{C}$: Grados Centígrados

a: Pendiente

ACN: Acetonitrilo

ANOVA: Análisis de Varianzas de un Factor

b: Intercepto

cc: Células Calciformes

CD: Ciclodextrinas

CHI: Quitosano

Cl: Ión Cloro

CLX: Clorhexidina digluconato

cm: Centímetros

CV: Coeficiente de Variación

d: Desmosomas

D₂O: Agua Deuterada

DLS: Dynamic Light Scattering (Dispersión Dinámica de la Luz)

DS: Desviación Estándar

DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido

DSF: Diagrama de Solubilidad de Fases

EDX: Espectroscopia de Rayos x de Energía Dispersa

EFS: Extracción en Fase Sólida

ej.: Ejemplo

EMA: Agencia Europea de Medicina

F: Flujo

FDA: Food and Drug Administration

Fs: Femtosegundo

FT-IR: Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier

g: Gramos

H: Entalpía

h: Horas

H₀: Hipótesis Nula

H₂O: Agua

HCl: Ácido Clorhídrico

HCT_(50 µg): Ensayos realizados con 50 µg de HCT iniciales

HCT_(750 µg): Ensayos realizados con 750 µg de HCT iniciales

HCT_(NPs): Ensayos realizados con NPs cargadas con HCT/βCD

HCT/βCD: Complejo de inclusión de HCT con βCD

HCT: Hidroclorotiazida

HCT_{Lio}: Hidroclorotiazida Liofilizada

He – Ne: Láser de Helio y Neón

HIV: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

HVB: Virus de la Hepatitis B

IFA: Ingrediente Farmacéutico Activo

ITC: Titulación Isotérmica Calorimétrica

K: Constante de Estabilidad Química

*K*_{1:1}: Constante de Estabilidad Química de estequiometría 1:1

KBr: Bromuro de Potasio

kCal: Kilocalorías

kg: Kilogramos

kJ: Kilojoule

L: Ligando

LC: Límite de Cuantificación

LD: Límite de Detección

Lio: Liofilizado

M: Molar

mA: MiliAmpere

MD: Dinámica Molecular

MeOH: Metanol

MF: Mezcla Física

mg: Miligramos

min: Minutos

mit: Mitocondrias

mL: Mililitros

mM: Milimolar

mm: Milímetros

MMT: Montmorillonita

Na⁺MMT: Montmorillonita sódica

MOAR: Microscopía Óptica de Alta Resolución

MUC: Mucina Gástrica Porcina

mv: Microvellosidades

mV: MiliVoltios

n: Núcleo

N₂: Nitrógeno

Na⁺: Ión Sodio

NaCl: Cloruro de Sodio

NaNO₃: Nitrato de Sodio

NaOH: Hidróxido de Sodio

nm: Nanómetros

NPs: Nanopartículas

ns: Nanosegundos

O₂: Oxígeno

OMS: Organización Mundial de la Salud

p: Probabilidad

P_{app}: Coeficiente de Permeabilidad Aparente

PBS: Soluciones Tamponadas de Fosfatos

PDI: Índice de Polidispersidad

ps: Picosegundo

r^2 : Coeficiente de Correlación

RESP: Potencial Electrostático Restringido

RMSD: Desviación de la Raíz Cuadrada Media

ROE: Efecto de Overhauser en Sistemas Giratorios

ROESY: Espectroscopia de Efecto de Overhauser en Sistemas Giratorios

rpm: Revoluciones por Minuto

S : Solute

S_0 : Solubilidad inicial del Solute

S_{max} : Solubilidad máxima del Solute

S: entropía

SCB: Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión

TGA: Análisis Termogravimétrico

TGI: Tractogastrointestinal

TPP: Tripolifosfato de Sodio

ua: Uniones Adherentes

uc: Uniones Celulares

USP: United States Pharmacopeia

UV-Vis: detector UV-Visible

v: Vellosidades

XRD: Espectroscopia de Difracción de rayos X

XRF: Espectrometría de Fluorescencia de rayos X

➤ Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de tesis, es mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos a través de la obtención de nuevos sistemas de liberación nanoparticulados que combinen quitosano y ciclodextrinas; o bien, quitosano con arcillas minerales.

➤ Objetivos específicos

Este proyecto tiene los siguientes objetivos específicos:

✓ Desarrollar y caracterizar nuevos sistemas de liberación nanoparticulados, destinados para la administración oral, combinando β -Ciclodextrina y Quitosano; utilizando como fármaco modelo Hidroclorotiazida.

✓ Desarrollar y caracterizar nuevos bionanocompuestos, destinados a la administración bucal de Clorhexidina, combinando Quitosano y Montmorillonita.

RESUMEN

Tras la administración oral, un fármaco tiene que superar varios obstáculos antes de alcanzar la circulación sistémica: liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción. Un gran número de fármacos permanecen pobremente disponibles cuando son administrados por la vía oral. Como alternativa a esta vía, es muy estudiada la vía de administración bucal, debido a sus características, como el escaso contenido de enzimas degradativas, la alta tasa de permeabilidad, la importante vascularización de la zona y que se evita el efecto de primer paso hepático; aunque tiene algunas desventajas, como por ejemplo, el poco tiempo de residencia en el sitio de administración.

En los últimos años, se han desarrollado diversas estrategias tendientes a superar las barreras que deben vencer los fármacos para alcanzar la circulación sistémica, como por ejemplo la formación de complejos con ciclodextrinas, la obtención de nanopartículas y el desarrollo de bionanocompuestos.

La primera parte de esta tesis doctoral, se centró en el desarrollo de un complejo de inclusión entre la Hidroclorotiazida (HCT), el huésped y la β -Ciclodextrina (β CD), el receptor. La HCT es un diurético de la clase de las tiazidas que posee baja solubilidad en agua y escasa permeabilidad intestinal, por lo cual se lo utilizó como fármaco modelo para la formación de dicho complejo.

El complejo HCT/ β CD fue exhaustivamente estudiado, utilizando metodologías en solución, en estado sólido y métodos computacionales. Se pudo corroborar, por medio del empleo de las diferentes técnicas, que el complejo efectivamente se formó, ingresando completamente la HCT a la cavidad de la β CD. Este complejo mejoró algunas propiedades de la HCT ya que aumentó su solubilidad acuosa e incrementó la velocidad de disolución del fármaco. Los resultados computacionales tuvieron una buena correlación con los resultados obtenidos de manera experimental.

La segunda etapa de este trabajo de tesis, estuvo enfocada en la obtención de nanopartículas (NPs) poliméricas, especialmente de quitosano. Estas NPs se obtuvieron utilizando la técnica de la gelación iónica; y se les incorporó el

complejo HCT/ β CD, estudiado anteriormente. Las NPs fueron caracterizadas en cuanto a su tamaño, potencial Z y morfología; encontrándose que presentaban un tamaño promedio de 350 nm, con una carga de superficie de +30 mV y que eran de forma esférica de la superficie lisa. La cantidad de HCT acomplejada con la β CD cargada en las NPs, fue de aproximadamente 350 μ g por cada pellet de NPs obtenido.

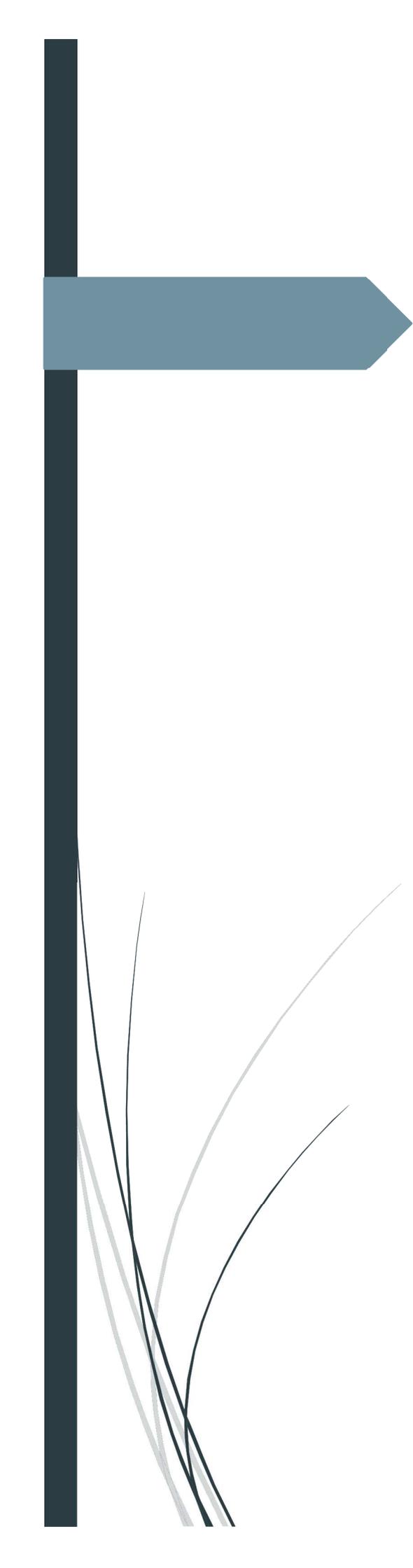
Se evaluaron biofarmacéuticamente las NPs cargadas con el principio activo, llevando a cabo estudios de mucoadhesión, estudios de toxicidad intestinal y ensayos de permeabilidad *in vitro*. Los resultados evidenciaron que las NPs efectivamente poseen propiedades mucoadhesivas, las cuales fueron comprobadas por diversas técnicas; que la HCT tiene efectos tóxicos sobre el epitelio que recubre el intestino, afectando de esta manera la velocidad de absorción y la permeabilidad aparente del fármaco; y que se obtuvo un sistema de liberación sostenida del principio activo, ya que éste se libera lentamente del sistema nanoparticulado a causa de la acción de las enzimas presentes en el intestino, quedando disponible para su absorción.

Por lo tanto, las NPs demostraron tener varias ventajas: una de ellas son sus propiedades mucoadhesivas; otra, es su capacidad de actuar como un sistema de reservorio, ya que la liberación del fármaco se produjo de manera lenta y sostenida, desde el sistema nanoparticulado; y como consecuencia de la ventaja anterior, posee un efecto protector sobre el epitelio intestinal, ya que el daño observado en este caso, fue mucho menor al que se evidenció en los ensayos realizados con HCT sola.

Por último, en esta tesis, se planteó el desarrollo de nanocompuestos, combinando un polímero natural, como es el quitosano y una arcilla mineral, como la Montmorillonita. El objetivo planteado para esta parte del trabajo, fue la obtención de un sistema de liberación sostenida de aplicación bucal. La efectividad de este nanocompuesto obtenido se evaluó utilizando un fármaco modelo, Clorhexidina, el cual es un antiséptico de uso tópico, ampliamente utilizado en la actualidad en el área de la odontología, entre otras aplicaciones terapéuticas.

El sistema se caracterizó fisicoquímicamente utilizando variadas técnicas de análisis para el estado sólido, por medio de las cuales, se comprobó la formación del nanocompuesto en estudio. Además, se realizaron ensayos de liberación *in vitro*, con el fin de evaluar la cinética de liberación del fármaco; encontrándose que corresponde a un modelo de liberación que depende tanto del hinchamiento como de la erosión del sistema. También, se llevaron a cabo estudios de mucoadhesión *in vitro*, demostrándose que dicho sistema tiene propiedades mucoadhesivas ya que interacciona con la mucina gástrica porcina. Y por último, se desarrollaron estudios microbiológicos, los cuales tuvieron como objetivo demostrar que el fármaco es capaz de difundir desde el nanocompuesto sin perder su actividad antimicrobiana.

Por todo lo expuesto, se concluye que en el presente trabajo de tesis, ha sido posible desarrollar diversos sistemas de liberación de fármacos que podrían utilizarse como estrategias, ya que contribuyen a mejorar ciertas propiedades biofarmacéuticas desfavorables de algunos fármacos.



Introducción

Capítulo 1

Farm. Renée Onnainty
TESIS DOCTORAL

Capítulo 1:

INTRODUCCIÓN

➤ Sistemas de Liberación de Fármacos

La investigación farmacéutica se centra, desde hace años, en la búsqueda de nuevas moléculas que den respuesta terapéutica a las enfermedades aún por resolver y a las de última aparición. Sin embargo, no descuida la búsqueda de nuevas formulaciones que optimicen la eficiencia de los fármacos de actividad farmacológica reconocida.

De forma simultánea a la investigación de nuevas moléculas de fármacos o de su mejora, la investigación y desarrollo galénico lleva a cabo trabajos dirigidos a la búsqueda de novedosas formas de administración, que también suponen un claro beneficio para el paciente, por cuanto optimizan la actividad terapéutica al:

- Aprovechar totalmente la cantidad de fármaco administrado mediante una reducción de la dosis del ingrediente farmacéutico activo incluido en el medicamento.
- Disminuir o eliminar el riesgo de efectos no deseados (secundarios o tóxicos) de los medicamentos.
- Mejorar la posología, buscando los siguientes objetivos: una vía de administración más cómoda y la reducción del número de tomas/día. En el intento de conseguir una dosis única cada 24 h y tanto mejor, cuando los intervalos de tiempo sean cada vez más amplios.

De esta manera, surgen formas farmacéuticas de (Rodríguez y col., 2000):

- **Liberación retardada:** el fármaco se libera total y masivamente, pero no de forma inmediata a su administración, sino que lo hace al cabo de un cierto tiempo prefijado.
- **Liberación prolongada:** tras la liberación inmediata de una dosis inicial de principio activo, se continúa liberando cantidades que aseguran niveles plasmáticos terapéuticos durante al menos 6-8 h.

- **Liberación sostenida:** después de la cesión inicial de fármaco, la liberación del mismo se prolonga durante un tiempo relativamente largo, normalmente 24 h.

Como término general que reúne las diferentes formas de liberación de fármacos, previamente mencionadas, se utiliza el de **sistema de liberación modificada**, donde se incluyen todas aquellas en las que en su diseño intervienen modificaciones en el proceso tecnológico, que son determinantes del lugar de liberación y del control de la liberación del fármaco. Todas estas formas farmacéuticas pueden estar destinadas a la administración por distintas vías, ya sea oral, bucal, inyectable, tópica, etc.

➤ Vías de Administración

La **vía de administración oral** es una de las formas más atractivas para la dosificación de fármacos porque se asocia con la administración sin dolor y con la conveniencia, la conformidad y el alto cumplimiento del paciente.

Tras la administración oral, un fármaco tiene que superar varios obstáculos antes de alcanzar la circulación sistémica: liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción (figura 1.1). Un gran número de fármacos permanecen pobremente disponibles cuando son administrados por la vía oral. Entre otras razones, este factor importante puede estar relacionado, al menos, con uno de los siguientes efectos que pueden sufrir la mayoría de los principios activos: 1) baja permeabilidad a través de la mucosa o permeabilidad restringida a una región específica en el intestino; 2) pobre solubilidad en el medio acuoso del lumen del tractogastrointestinal; 3) ausencia de estabilidad en el interior del intestino (Inchaurreaga y col., 2014).

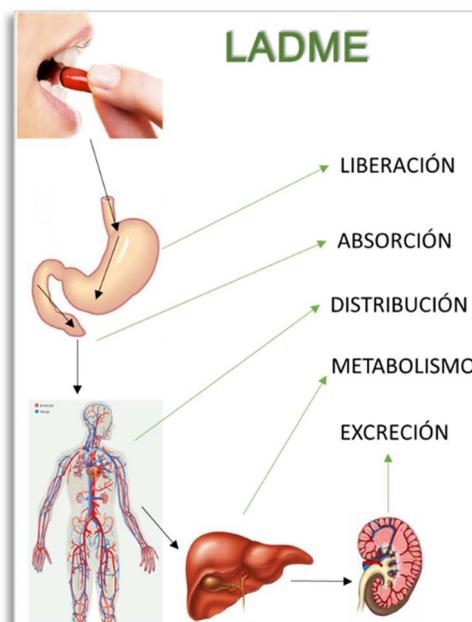


Figura 1.1: Administración oral de fármacos.

Como alternativa a la vía oral, es muy estudiada la **vía de administración bucal**, debido a sus características ventajosas. Esta vía tiene un escaso contenido de enzimas degradativas, una tasa de permeabilidad muy aceptable, se encuentra altamente vascularizada y evita el efecto de primer paso hepático. Los factores que principalmente limitan la absorción por esta vía son la exposición al flujo salival y la deglución.

En la mucosa oral se pueden distinguir cuatro regiones potenciales para la administración de fármacos: bucal, sublingual, palatal y gingival (figura 1.2). Entre ellas, la región sublingual, es la más interesante, ya que tiene algunas características útiles para aumentar la biodisponibilidad de los fármacos en el caso de que los ingredientes activos presenten propiedades biofarmacéuticas desfavorables.

La membrana del tejido sublingual es fina y altamente permeable, características muy importantes para el caso en que se necesite una pronta aparición del fármaco en el sitio de acción. Tiene una considerable área superficial y un alto flujo sanguíneo en esta región bucal, lo cual permite un rápido acceso a la circulación sistémica. Además, esta área es de fácil acceso y generalmente, la administración de fármacos a través de la misma es bien aceptada por el paciente (Perioli y col., 2013).

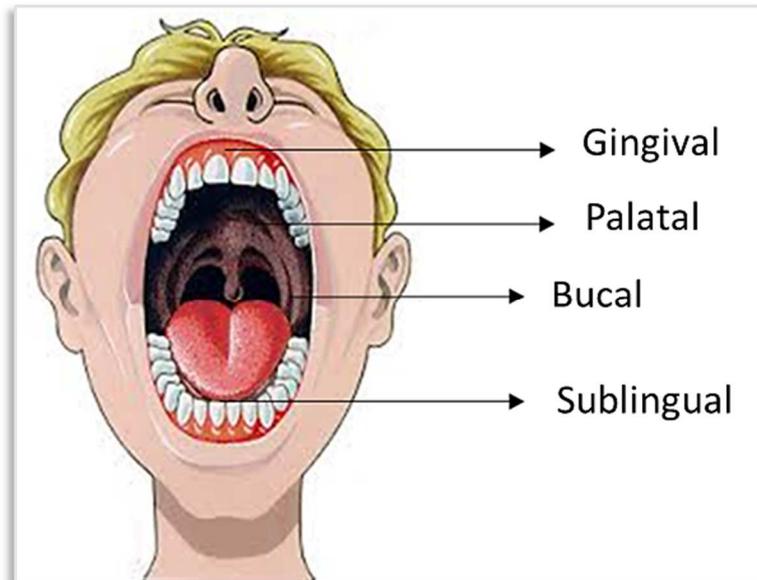


Figura 1.2: Esquema de las regiones de la boca.

Debido a todas las ventajas que presenta esta vía de administración, es que hay un gran interés en la investigación sobre la utilización de ésta para mejorar la biodisponibilidad de muchos fármacos (Rodríguez y col., 2000).

A causa de que existen numerosas barreras que el fármaco debe vencer para alcanzar la circulación sistémica, se han desarrollado diversas estrategias tendientes a superar dichos inconvenientes. Los avances en la tecnología y los biomateriales, proporcionan una ventaja a los científicos para poder obtener sistemas de administración de fármacos eficaces.

Actualmente, se está estudiando el empleo de *ciclodextrinas* para mejorar las propiedades biofarmacéuticas desfavorables de algunos fármacos, como por ejemplo la baja solubilidad; así como, el uso de *nanotransportadores*, capaces de cruzar y transportar las moléculas asociadas, a través de la barrera de la mucosa intestinal y prevenir el ataque enzimático de los fármacos; además, del desarrollo de sistemas bioadhesivos híbridos orgánicos-inorgánicos, denominados *bionanocompuestos*, para aumentar el tiempo de retención del fármaco y por lo tanto su biodisponibilidad.

A continuación, se describe brevemente en qué consiste cada una de las estrategias mencionadas previamente.

➤ Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs), son oligosacáridos cíclicos de glucosa, que presentan una cavidad interna hidrofóbica y una superficie externa hidrofílica. Químicamente, las CDs consisten en al menos seis unidades de D-(+) glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos α -(1-4). Las tres CDs naturales α -, β - y γ -CD, con 6, 7 u 8 unidades de glucosa, respectivamente, difieren en el tamaño del anillo y en su solubilidad (figura 1.3). Estas CDs tienen una solubilidad acuosa limitada debido a la presencia de fuertes enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos de hidroxilos secundarios, lo cual reduce su capacidad de interactuar con las moléculas de agua de su alrededor.

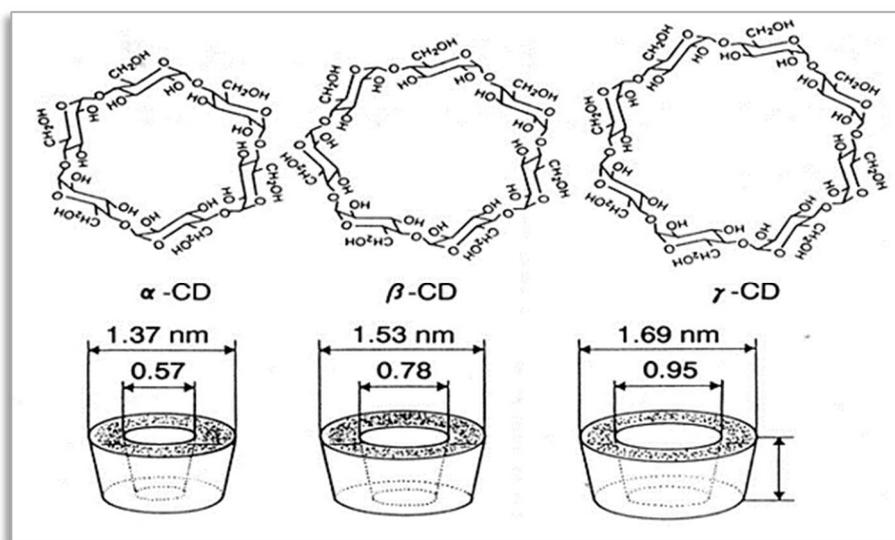


Figura 1.3: Características de las CDs naturales.

Las CDs naturales, pueden derivatizarse con el objeto de modificar convenientemente su solubilidad y sus propiedades de acomplejación; de esta manera se extiende el rango de aplicaciones farmacéuticas de las mismas (Mura, 2015). Entre los derivados de mayor interés en la industria farmacéutica encontramos a los que provienen de la hidroxipropil-CD (ej: HP- β CD, HP- γ CD), la β CD metilada al azar (RM- β CD), la sulfobutiléter- β CD (SBE- β CD) y las llamadas CDs ramificadas, como la glucosil- β CD (Messner y col., 2010).

La β -Ciclodextrina (β CD) es la más utilizada para aplicaciones farmacéuticas, ya que es la más accesible, de bajo costo y porque su disponibilidad y tamaño de la cavidad son los adecuados para un amplio rango de fármacos. Además, en los últimos años, las CDs se han propuesto para aumentar la cantidad de fármaco que se incorpora en sistemas como las nanopartículas poliméricas, los liposomas y las micropartículas (Agüeros y col., 2009).

Las CDs pueden formar complejos de inclusión con pequeñas moléculas y porciones de grandes compuestos. La inclusión de un fármaco huésped, o una porción del mismo, en dicha cavidad, puede tener como consecuencia el aumento de la solubilidad aparente, la mejora de la estabilidad física y química, el incremento de la tasa de disolución y de la biodisponibilidad de los fármacos acomplejados con ellas. Las CDs son usualmente utilizadas en otros sectores de la industria, además de la farmacéutica, como las industrias cosmética, alimentaria y química, ya que aprovechan su capacidad de incluir en su cavidad una gran variedad de moléculas hidrofóbicas.

➤ Nanopartículas Poliméricas

Las nanopartículas (NPs) se definen frecuentemente como partículas coloidales sólidas en un rango de 10 – 1000 nm. El término *nanopartículas poliméricas* es un término general, dado específicamente para nanoesferas y nanocápsulas. Las *nanoesferas* son partículas de matrices en las cuales su masa completa es sólida, en donde las moléculas de principio activo pueden estar adsorbidas en la superficie o encapsuladas en la partícula; por lo general, son de forma esférica. Las *nanocápsulas* son sistemas vesiculares, que actúan como una clase de reservorio, en la cual las sustancias atrapadas están confinadas a la cavidad de las mismas, que consiste en un corazón líquido (oleoso o acuoso) rodeado por una coraza sólida. Los esquemas se presentan en la figura 1.4 (Rao y col., 2011).

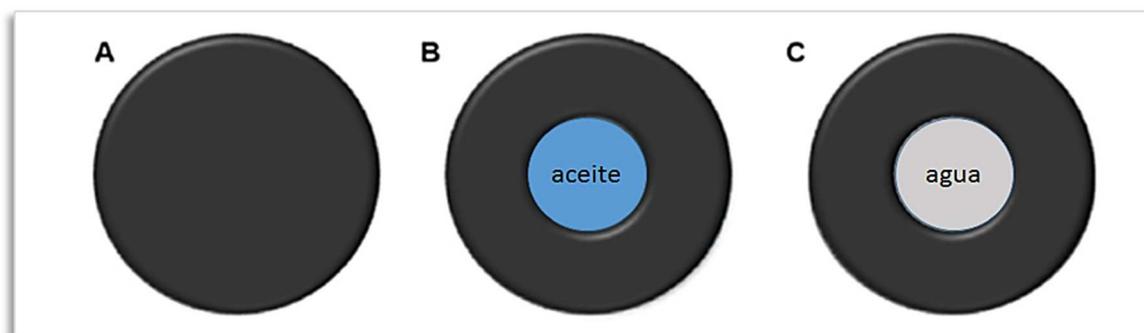


Figura 1.4: Clasificación de nanopartículas. a) Nanoesferas. b) Nanocápsulas conteniendo aceite. c) Nanocápsulas conteniendo agua.

La ingeniería de NPs, que abarca a una variedad de sistemas de materiales nanoestructurados orgánicos e inorgánicos, se aplica en la actualidad a una amplia variedad de campos, incluyendo la liberación de fármacos y genes, biosensores, tratamientos contra el cáncer y diagnósticos. Diferentes tipos de sistemas nanoestructurados, diseñados para la liberación de fármacos, han sido extensamente investigados en décadas pasadas (Mendes y col., 2015); entre ellos, se encuentran los liposomas, las micelas, las nanopartículas metálicas, las lipídicas y las poliméricas.

Existen diversos materiales empleados como componente principal de la matriz que formará las nanopartículas, dentro de ellos se incluyen las grasas (fosfolípidos, ácidos grasos), las proteínas (gelatina, albúmina) y los polímeros, ya sean naturales (dextrano, quitosano, alginato), semisintéticos (derivados de celulosa) o sintéticos [poli(acrilatos), poli(anhídridos), poli(acrilamidas) y poli(ésteres)].

Dentro de los polímeros sintéticos, el más utilizado para la elaboración de nanopartículas mediante el método de emulsión de solvente es el copolímero sintético ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA). Éste polímero es biodegradable y biocompatible; presenta baja toxicidad comparada con otros polímeros y es muy apropiado como sistema de liberación en ambientes biológicos, siendo aprobado por la FDA para su utilización en sistemas de liberación controlada de fármacos (Gómez-Gaete, 2014).

Particularmente, las NPs de quitosano se han estudiado especial y ampliamente para la administración de fármacos. Uno de los factores principales es, que influyen su habilidad de promover la absorción oral de los fármacos incorporados en ellos y su capacidad de desarrollar interacciones bioadhesivas en el intestino. En efecto, el desarrollo de interacciones adhesivas, entre las NPs y la mucosa, podrían inducir a la inmovilización de estos sistemas de liberación de fármacos en íntimo contacto con la membrana de absorción; así, podrían facilitar el establecimiento de un gradiente de concentración del fármaco, cargado en el “reservorio” (NPs), a la circulación y, como consecuencia, un aumento de la absorción y la biodisponibilidad (Agüeros y col., 2009).

Actualmente, las aplicaciones terapéuticas de las NPs son tan diversas como las vías por las cuales pueden ser administradas destacando la vía oral, pulmonar, oftálmica, endovenosa, intramuscular, intraocular e intraarticular, entre otras.

➤ Bionanocompuestos

En la última década, los bionanocompuestos, basados en arcillas minerales y biopolímeros para aplicaciones farmacéuticas, han atraído una gran atención (Aguzzi y col., 2007; Viseras y col., 2010). Estos materiales híbridos combinan las propiedades de ambos componentes, orgánicos e inorgánicos, tales como el hinchamiento, la captación de agua, las propiedades mecánicas, el comportamiento térmico, la reología y la bioadhesión (Günster y col., 2007).

Los bionanocompuestos pueden estar constituidos por una gran variedad de materiales, los cuales pueden ser:

- Componentes orgánicos: proteínas, polisacáridos, colágeno, carragenato, alginato, celulosa y quitosano.
- Materiales inorgánicos: arcillas laminares, hidróxidos laminares y α -fosfato de Zirconio, entre otros.

Entre los bionanocompuestos en estudio, el de mayor interés, está constituido por montmorillonita (MMT) y quitosano (CHI), especialmente para aplicaciones biomédicas (ingeniería de tejidos) (Sandri y col., 2014).

Los bionanocompuestos MMT/CHI son capaces de mejorar la estabilidad térmica y las propiedades mecánicas del CHI (Marroquin y col., 2013), mientras que, simultáneamente retardan las propiedades de hinchamiento del polímero. Así, los sistemas obtenidos MMT/CHI, pueden retrasar la disolución de la matriz de CHI en medio ácido, resultando en una lenta liberación del fármaco desde el sistema (Darder y col., 2003).

➤ **Montmorillonita**

La MMT (figura 1.5) es un mineral del grupo de los silicatos y dentro de ellos pertenece a las llamadas arcillas. Estas arcillas forman parte de la familia de las esmectitas, dentro de las cuales se encuentran varias otras arcillas como la vermiculita, el talco, la hectorita y la bentonita. Las dos arcillas más utilizadas como materia prima para las nanoarcillas son la montmorillonita y la bentonita.



Figura 1.5: MMT en estado natural.

La MMT es un hidrosilicato de magnesio y aluminio, entre otros elementos. Tiene una estructura laminar formada por capas de sílica tetraédrica colocadas sobre alúmina octaédrica. El esquema de esta estructura se presenta en la figura 1.6.

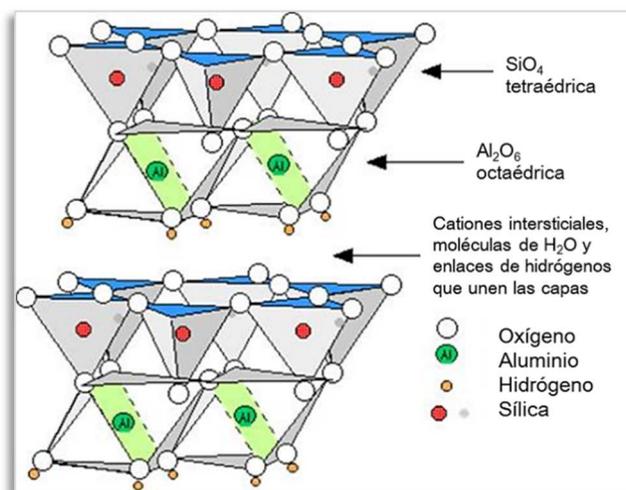


Figura 1.6: Esquema de la estructura laminar de la MMT

Los polímeros en las dispersiones de MMT interactúan con las partículas de la arcilla, de acuerdo con su característica iónica o no iónica.

La MMT y otras arcillas minerales, como la bentonita, se combinan con sustancias poliméricas para proporcionar materiales que se han convertido en recursos claves en la industria farmacéutica y en los campos biomédicos, como resultado de sus propiedades mejoradas y gran flexibilidad (Xie y col., 2013).

➤ Quitosano

Los polímeros quitina y quitosano (CHI) son aminopolisacáridos naturales con estructuras únicas, propiedades multidimensionales, funciones altamente sofisticadas y un amplio rango de aplicaciones biomédicas y otras áreas industriales. El CHI se obtiene a escala industrial por N-desacetilación termoalcalina de la quitina aislada de los desechos de crustáceos. Químicamente, el término CHI define a una familia de herteropolisacáridos lineales que están formados por 2-amino-2-deoxi-β-D-glucosa (unidades D-glucosamina) y 2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucosa (unidades N-acetyl-D-glucosamina) unidas en enlaces (1-4). La estructura del CHI se muestra en la figura 1.7.

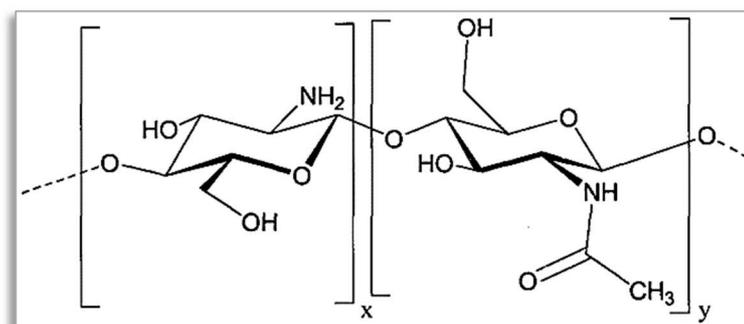


Figura 1.7: Estructura del quitosano.

Unidades x) D-glucosamina; y) N-acetil-D-glucosamina.

El CHI se considera un material con gran potencial, por sus grandes posibilidades de modificaciones estructurales para conferir propiedades y funciones deseadas. Numerosos grupos de investigación, han alcanzado un estado de intensa actividad en muchas partes del mundo, debido a las atribuciones positivas del CHI con respecto a su excelente biocompatibilidad y admirable biodegradabilidad, con seguridad ecológica y baja toxicidad. El CHI se ha convertido en un material de gran interés, no solo por ser un recurso subutilizado, sino también como un nuevo biomaterial funcional de gran potencial en varios campos (Pillai y col., 2009). Además, el CHI exhibe propiedades mucoadhesivas, por lo cual es utilizado para aumentar el tiempo de residencia de los fármacos en las membranas mucosas, incrementando de esta manera la biodisponibilidad de los mismos (Ayensu y col., 2012).

Las NPs de CHI, pueden sintetizarse por medio de una gran variedad de técnicas, dentro de las cuales encontramos electroespray, microemulsión, gelación iónica, difusión de solventes emulsificados, etc.

Entre ellas, la **gelación iónica** con tripolifosfato de sodio, como agente entrecruzante, es la técnica más utilizada para la obtención de NPs de CHI (la técnica se explica con mayor detalle en el capítulo 3 de este trabajo de tesis). Este método es simple, suave, poco tóxico y posible de aplicar a gran escala (Dong y col., 2013).

Como se mencionó anteriormente, el CHI también se utiliza para la obtención de bionanocompuestos. Este polímero puede interactuar con la MMT principalmente de dos maneras:

- El CHI puede adsorberse en la superficie de la arcilla debido a interacciones electrostáticas entre ambos componentes, provocando un colapso en el espacio interlaminar de la arcilla (Günister y col., 2007).
- Las cadenas de CHI pueden intercalarse entre las láminas de la arcilla, vía intercambio iónico (Darder y col., 2003).

En la figura 1.8 se presenta un esquema con ambos modelos de interacción polímero – arcilla.

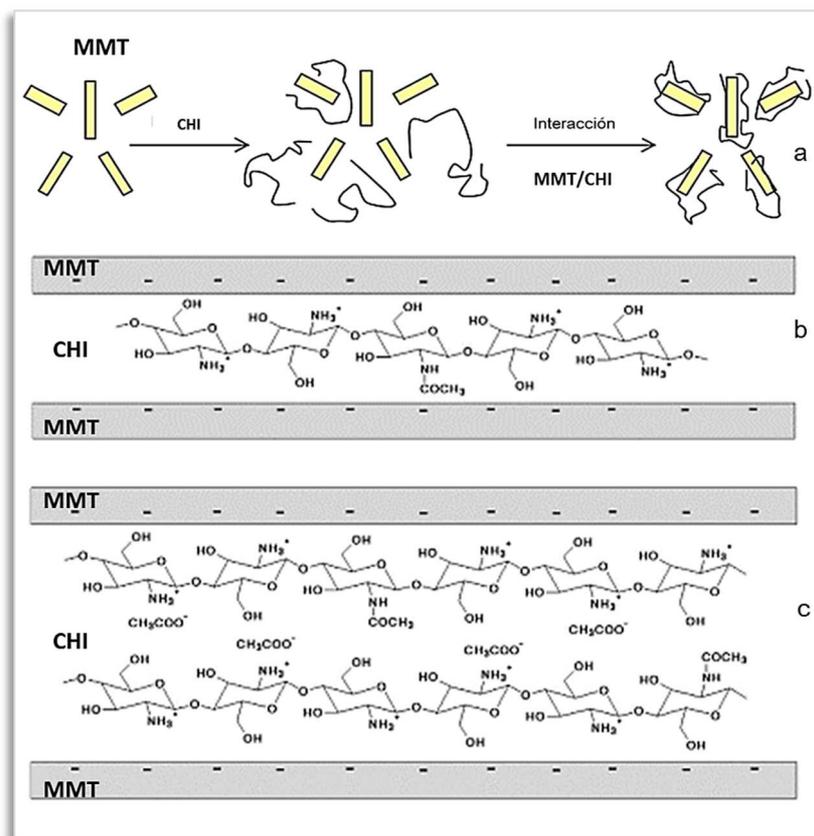


Figura 1.8: Modelos de interacción. a) Interacción superficial. b) Intercalación de una cadena polimérica. c) Intercalación de dos cadenas poliméricas.

Tanto las NPs como los bionanocompuestos son formulaciones bioadhesivas debido a la presencia de CHI en ellas; ya que, éste polímero le conferirle esta propiedad debido a sus características mucoadhesivas.

Todo sistema bioadhesivo debe sus propiedades a la inclusión de uno o varios tipos de moléculas poliméricas que, en condiciones apropiadas, son capaces de establecer interacciones con la superficie biológica, reteniendo así la forma farmacéutica que contiene al fármaco. Evidentemente, esas condiciones apropiadas no solo dependen de las características químicas y estructurales del polímero bioadhesivo, sino también de factores fisiológicos y variaciones experimentales (Rodríguez y col., 2000).

➤ **Formulaciones Mucoadhesivas**

Actualmente, existe un gran interés en el desarrollo de formulaciones, realizadas con polímeros mucoadhesivos como, alginato, gelatina, quitosano, derivados de la celulosa, entre otros. De hecho, estos sistemas presentan grandes ventajas en comparación con las formas de dosificación no adhesivas, como por ejemplo (Perioli y col., 2013):

- El contacto cercano entre la forma de administración y la mucosa.
- El mantenimiento de altas concentraciones de fármaco en la superficie de absorción por un prolongado período de tiempo.
- La inmovilización de la forma farmacéutica en una parte específica de la mucosa.
- La protección del principio activo del medio ambiente.

El concepto de polímeros mucoadhesivos fue introducido en la tecnología farmacéutica a principios de 1980 y recientemente, se ha aceptado como una estrategia prometedora para prolongar el tiempo de residencia de los compuestos en las mucosas del organismo. El desarrollo de novedosos sistemas de liberación de fármacos mucoadhesivos ha sido de gran interés para el

transporte de fármacos, ya que son capaces de adherirse a la capa de mucus que recubre los epitelios y a que podrían ayudar a evitar que las partículas atrapadas en esta capa sean removidas del sitio de acción (Oh y col., 2015).

➤ Bioadhesión

La bioadhesión es un caso particular de adhesión y podría definirse como el estado en el cual dos materiales, de los cuales al menos uno es de naturaleza biológica, entran en contacto cercano y permanecen juntos por un largo período de tiempo debido a los enlaces establecidos entre dichos materiales. Si la superficie biológica es una mucosa, entonces el fenómeno se denomina usualmente como **mucoadhesión**, y las interacciones pueden ocurrir principalmente con el mucus, pero también con las células epiteliales.

El mucus, es una parte esencial en el fenómeno de la mucoadhesión y es por esto que merece una atención especial al abordar el tema (Sosnik y col., 2014).

La **mucosa** recubre la superficie de la mayoría de los epitelios del organismo, proporcionando una barrera, separándolo del entorno externo. El mucus, está compuesto mayoritariamente por agua (95%), lípidos, sales inorgánicas y glicoproteínas llamadas mucina. Químicamente, la **mucina** está compuesta por una compleja y heterogénea mezcla de glicoproteínas de alto peso molecular. La mucina, le confiere la característica de gel al mucus y cumple numerosos roles biológicos, como por ejemplo lubricación; modulación de agua y absorción de electrolitos; protección del epitelio contra estrés mecánico y químico; y actúa como un filtro para las NPs y sustancias extrañas al organismo (Menchicchi y col., 2015).

En el esquema de la figura 1.9, se representan las interacciones mucoadhesivas, y la influencia que tiene el tamaño de las NPs y sus características adhesivas en este proceso; las cuales se describen a continuación (Sosnik y col., 2014):

- A. Después de la administración inicial, las partículas llegan a la mucosa; allí pueden interactuar y difundir a través del mucus, dependiendo de sus propiedades adhesivas.
- B. Las partículas pequeñas pueden difundir a través de la capa de mucus; mientras que, las partículas más grandes, al no ser capaces de difundir a través de dicha capa, interactúan en el lumen intestinal, estableciendo enlaces adhesivos con las cadenas de mucina.
- C. El mecanismo natural de *clearance* ocurre principalmente del lado del lumen intestinal y las partículas son progresivamente removidas de la mucosa; mientras que las NPs que han alcanzado la línea celular epitelial pueden penetrar a través del tejido.

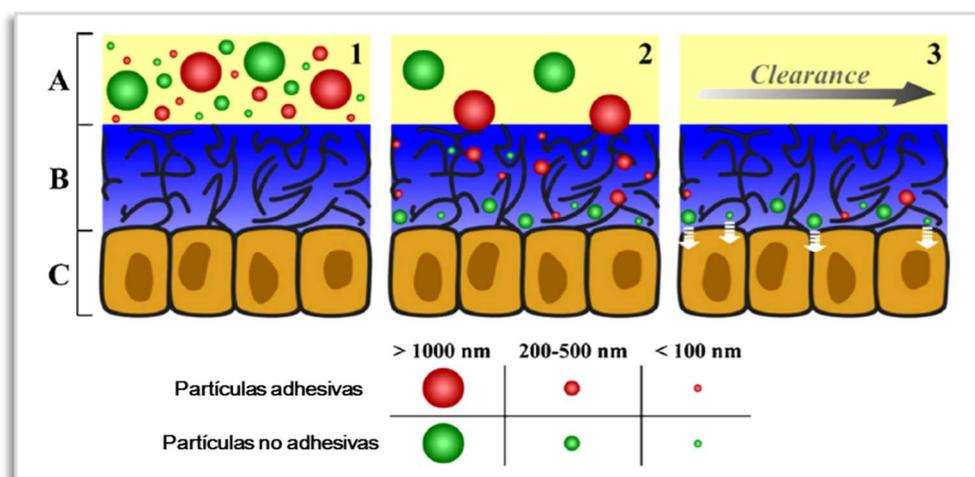


Figura 1.9: Representación esquemática de interacciones de varios tipos de partículas con la película de mucus. A) Ambiente externo. B) Capa de mucus. C) Revestimiento celular epitelial.

Las formas farmacéuticas bioadhesivas tienen como finalidad fijarse a la mucosas bucal, estomacal, intestinal, etc., con el fin de suministrar de forma continua la dosis del fármaco para que sea absorbido durante períodos prolongados de tiempo.

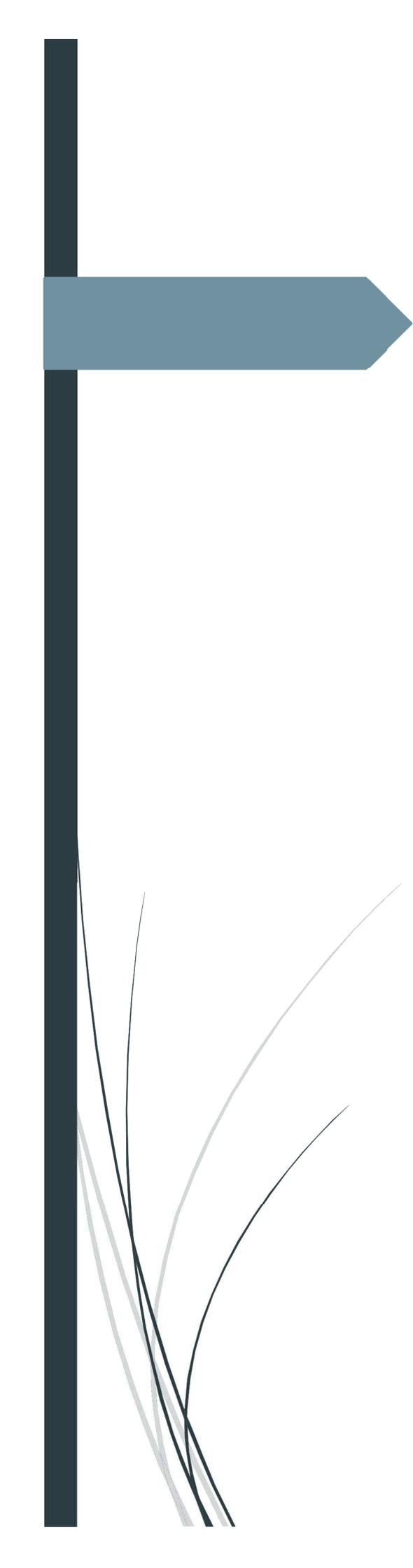
En base a todo lo expuesto, se planteó como objetivo principal de este trabajo de tesis el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos; particularmente sistemas de liberación modificada y mucoadhesivas, destinadas a distintas vías de administración como son la oral y la bucal.

BIBLIOGRAFÍA (en orden alfabético)

- Agüeros, M., Areses, P., Campanero, M. A., Salman, H., Quincoces, G., Peñuelas, I., & Irache, J. M. (2009). Bioadhesive properties and biodistribution of cyclodextrin-poly(anhydride) nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3-4), 231–240.
- Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C., & Caramella, C. (2007). Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations. *Applied Clay Science*, 36(1-3), 22–36.
- Ayensu, I., Mitchell, J. C., & Boateng, J. S. (2012). In vitro characterisation of chitosan based xerogels for potential buccal delivery of proteins. *Carbohydrate Polymers*, 89(3), 935–941.
- Darder, M., Colilla, M., & Ruiz-Hitzky, E. (2003). Biopolymer-clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. *Chemistry of Materials*, 15(20), 3774–3780.
- Dong, Y., Ng, W. K., Shen, S., Kim, S., & Tan, R. B. H. (2013). Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), 940–945.
- Gómez-gaete, C. (2014). NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS: TECNOLOGÍA Y APLICACIONES FARMACÉUTICAS (Polymeric nanoparticles : technologie and pharmaceutical applications). *Revista Farmacologica de Chile*, 7(2), 7–16.
- Günister, E., Pestreli, D., Ünlü, C. H., Atici, O., & Güngör, N. (2007). Synthesis and characterization of chitosan-MMT biocomposite systems. *Carbohydrate Polymers*, 67(3), 358–365.
- Inchaurreaga, L., Martín-Arbella, N., Zabaleta, V., Quincoces, G., Peñuelas, I., & Irache, J. M. (2014). In vivo study of the mucus-permeating properties of PEG-coated nanoparticles following oral administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
- Marroquin, J. B., Rhee, K. Y., & Park, S. J. (2013). Chitosan nanocomposite films: Enhanced electrical conductivity, thermal stability, and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1783–1791.
- Menchicchi, B., Fuenzalida, J. P., Hensel, a., Swamy, M. J., David, L., Rochas, C., & Goycoolea, F. M. (2015). Biophysical Analysis of the Molecular Interactions between Polysaccharides and Mucin. *Biomacromolecules*, 150218131922003.

- Mendes, L. P., Delgado, J. M. F., Costa, A. D. a., Vieira, M. S., Benfica, P. L., Lima, E. M., & Valadares, M. C. (2015). Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. *Toxicology in Vitro*, *29*, 1268–1274.
- Messner, M., Kurkov, S. V., Jansook, P., & Loftsson, T. (2010). Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, *387*(1-2), 199–208.
- Mura, P. (2015). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state : A review, 1–13.
- Oh, S., Wilcox, M., Pearson, J. P., & Borrós, S. (2015). Optimal design for studying mucoadhesive polymers interaction with gastric mucin using a quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D): Comparison of two different mucin origins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (August), 1–7.
- Perioli, L., & Pagano, C. (2013). Preformulation studies of mucoadhesive tablets for carbamazepine sublingual administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *102*(i), 915–922.
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *34*(7), 641–678.
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *36*(7), 887–913.
- Rodríguez IC, Cerezo A, S. I. (2000). Sistemas de liberación Bioadhesivos - Bioadhesive delivery systems. *Ars Pharmaceutica*, *1*(41), 115–128.
- Sandri, G., Bonferoni, M. C., Ferrari, F., Rossi, S., Aguzzi, C., Mori, M., ... Caramella, C. (2014). Montmorillonite-chitosan-silver sulfadiazine nanocomposites for topical treatment of chronic skin lesions: In vitro biocompatibility, antibacterial efficacy and gap closure cell motility properties. *Carbohydrate Polymers*, *102*(1), 970–977.
- Sosnik, A., das Neves, J., & Sarmiento, B. (2014). Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. *Progress in Polymer Science*, *39*, 2030–2075.
- Sosnik, A., & Sarmiento, B. (2014). Progress in Polymer Science Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes : A review, *39*, 2030–2075.

- Viseras, C., Cerezo, P., Sanchez, R., Salcedo, I., & Aguzzi, C. (2010). Current challenges in clay minerals for drug delivery. *Applied Clay Science*, *48*(3), 291–295.
- Xie, D. F., Martino, V. P., Sangwan, P., Way, C., Cash, G. a., Pollet, E., Avérous, L. (2013). Elaboration and properties of plasticised chitosan-based exfoliated nanobiocomposites. *Polymer (United Kingdom)*, *54*(14), 3654–3662.



Desarrollo y Caracterización de Complejos de Inclusión

Capítulo 2

Farm. Renée Onnainty
TESIS DOCTORAL

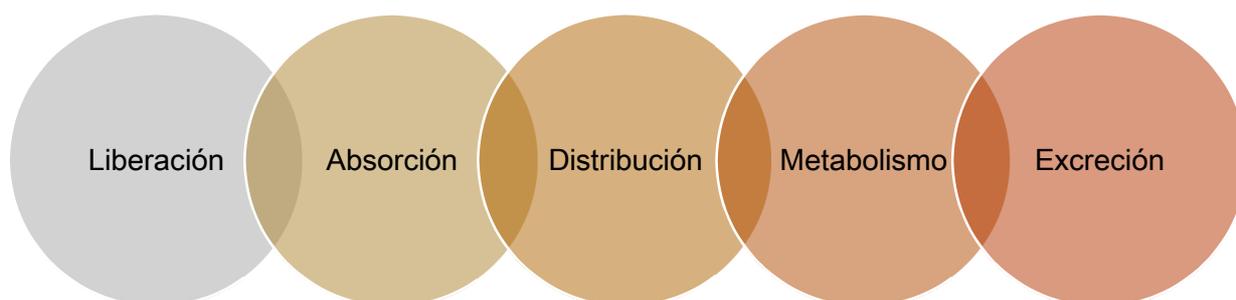
Capítulo 2:

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

INTRODUCCIÓN

La administración oral de los fármacos es generalmente la vía de administración más conveniente y preferida por las personas, ya que no implica dolor. Una de sus principales ventajas, es el alto cumplimiento del tratamiento por parte del paciente. Las empresas farmacéuticas tienen gran interés en el desarrollo de sistemas de administración oral de ingredientes farmacéuticos activos (IFA) para aquellos que actualmente están en el mercado sólo como inyectables, así como para nuevas entidades químicas (Pouton, 2006).

Para producir sus acciones terapéuticas características, un fármaco debe alcanzar concentraciones adecuadas en los sitios donde actúa. Las concentraciones logradas, a pesar de que están en función de la dosis del producto administrado, también dependen de la magnitud y la tasa de su absorción, distribución, unión o localización en tejidos, biotransformación y excreción (Goodman Gilman A., 2011).



Una vez administrada la forma farmacéutica, el IFA sufre diferentes procesos hasta llegar a disolverse en el fluido del tractogastrointestinal (TGI) y

posteriormente, ser absorbido. El medicamento¹, en primer lugar, se desintegra en gránulos o agregados; a continuación estos gránulos se rompen y originan partículas individuales, a partir de las cuales el IFA es disuelto y solubilizado. Estando en solución, el fármaco tiene la posibilidad de absorberse, para lo cual debe sufrir un proceso de permeación y posterior conducción hacia la sangre. Cada uno de estos procesos depende de diferentes propiedades fisicoquímicas del principio activo y de las características de la forma farmacéutica que determinan la velocidad a la que estos eventos ocurren y por ende, definen la velocidad de absorción.

Varios métodos se han descrito para aumentar la solubilidad de fármacos poco solubles, por ejemplo la formación de profármacos, la adición de surfactantes, la formación de sales, dispersiones sólidas y la reducción del tamaño de las partículas (Leuner y col., 2000). Además, son muy utilizadas las ciclodextrinas, las cuales representan un grupo importante de excipientes para este propósito.

➤ Ciclodextrinas

Como se mencionó en el capítulo 1 de esta tesis, las CDs tienen una estructura cíclica formada por unidades de glucopiranosas, las cuales presentan una cavidad interna hidrofóbica y una superficie externa hidrofílica, en donde se localizan los grupos hidroxilos (Bonini et al., 2006). Esta estructura característica de las CDs se debe a que las unidades de glucosa están unidas por enlaces α -(1-4), lo cual le da una conformación de silla a las unidades de glucopiranosas, formando un cono con los grupos hidroxilos secundarios que se extienden desde el borde más ancho y los grupos hidroxilos primarios desde el borde estrecho. En solución acuosa estos grupos hidroxilos forman puentes de hidrógeno con el agua, haciendo que la CD sean solubles en agua (Messner et al., 2010).

¹ Medicamento: toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a la que se lo administra (Farmacopea Argentina, 8^o Edición).

Éstos oligosacáridos son utilizados como excipientes en numerosas formulaciones farmacéuticas comerciales. Se conoce que las CDs forman agregados de tamaño nanométrico en soluciones acuosas, lo cual tiene un gran potencial para el desarrollo de sistemas de liberación de principios activos sofisticados.

Cuando la cavidad de la CD se llena con moléculas de otra sustancia, al sistema obtenido se lo llama **complejo de inclusión**. Los complejos de inclusión son entidades que integran dos o más moléculas, como se muestra en la figura 2.1. Se forman complejos del tipo huésped:receptor, en donde la CD es el receptor y el fármaco es el huésped, el cual puede ingresar total o parcialmente dentro de la cavidad. Esto ocurre por la interacción de fuerzas físicas, sin uniones covalentes.

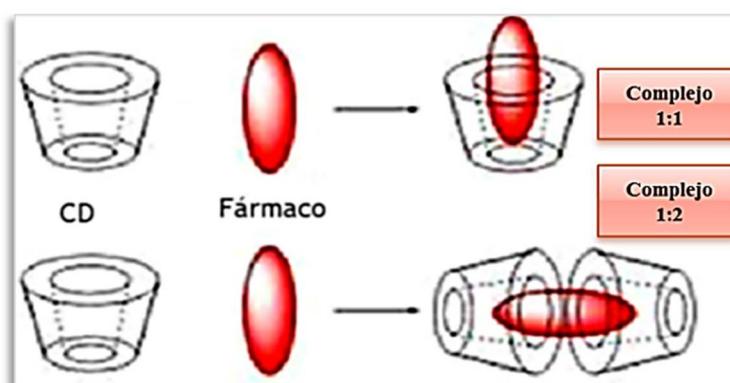
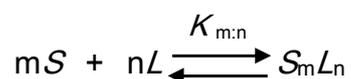


Figura 2.1: Tipos de complejos de inclusión de CDs.

La formación de un complejo de inclusión S_mL_n con CD es un proceso reversible, que responde a la siguiente reacción:



donde, m es el número de moléculas de soluto (S) asociadas con n moléculas de ligando (L) para formar un complejo con estequiometría m:n.

Los complejos huésped:receptor más comunes son los que tienen una estequiometría 1:1, aunque pueden existir otros con estequiometría 1:2 o incluso diferentes.

Cada CD tiene la habilidad de formar complejos de inclusión huésped:receptor, con moléculas huésped específicas, dicha habilidad depende de un ajuste apropiado de la molécula huésped en la cavidad de la CD. Las principales ventajas de las CDs nativas como transportadores de fármacos son (Fermeglia y col., 2003):

- ✓ Tienen una estructura química bien definida, y poseen sitios potenciales para modificaciones químicas.
- ✓ Las distintas CDs proporcionan cavidades de diferentes tamaños.
- ✓ Tienen baja toxicidad y baja actividad farmacológica.
- ✓ El principio activo incluido en la cavidad puede protegerse de su biodegradación.

Los complejos con CDs en el campo farmacéutico, son principalmente utilizados para aumentar la solubilidad acuosa y la disolución de fármacos poco solubles en agua y además, para mejorar su estabilidad y biodisponibilidad. También, la encapsulación molecular en CDs es una estrategia que puede utilizarse para enmascarar sabores y olores desagradables, disminuir la evaporación de sustancias volátiles, proteger a las moléculas sensibles de la luz o el oxígeno, convertir líquidos y aceites en polvos que fluyen fácilmente, reducir la irritación local provocada por los fármacos y disminuir problemas de incompatibilidad entre sustancias (Mura, 2015).

Las condiciones que debe reunir un IFA huésped, para formar un complejo son:

- ✓ La molécula debe tener más de 5 átomos (carbono, fósforo, sodio, nitrógeno, entre otros); de lo contrario es demasiado pequeña para un ajuste dentro de la cavidad. Pero debe ser menor a 5 anillos condensados; de lo contrario es demasiado grande para entrar en la cavidad.
- ✓ La solubilidad en agua debe ser menor a 10 mg/mL.
- ✓ El punto de fusión tiene que ser menor a 250 °C; de lo contrario las fuerzas cohesivas entre las moléculas son muy fuertes.

✓ El peso molecular debe estar entre 100 – 400 g/mol, ya que con moléculas muy pequeñas, el complejo es muy débil y, si son muy grandes, no entran en la cavidad.

➤ Hidroclorotiazida

La Hidroclorotiazida (HCT), 6-cloro-3,4dihidro-2H-1,2,4-benzotiazina-7sulfonamida-1,1-dioxido (figura 2.2), es una tiazida diurética muy conocida y ampliamente utilizada.

Las tiazidas y sus derivados, son seguras y activas cuando se las administra por vía oral, pero son diuréticos relativamente débiles. La HCT, como el resto de las tiazidas, actúa principalmente en los segmentos iniciales del túbulo distal del riñón, donde inhibe la reabsorción de NaCl al fijarse al co-portador responsable del co-transporte electroneuronal de los iones Na^+ y Cl^- . Aumenta la excreción de estos iones y el agua correspondiente. Esta clase de fármacos se utilizan comúnmente en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca leve y en casos de hipertensión. Existen muchas tiazidas, pero la única diferencia entre ellas es la duración en su acción (Neal, 2007).

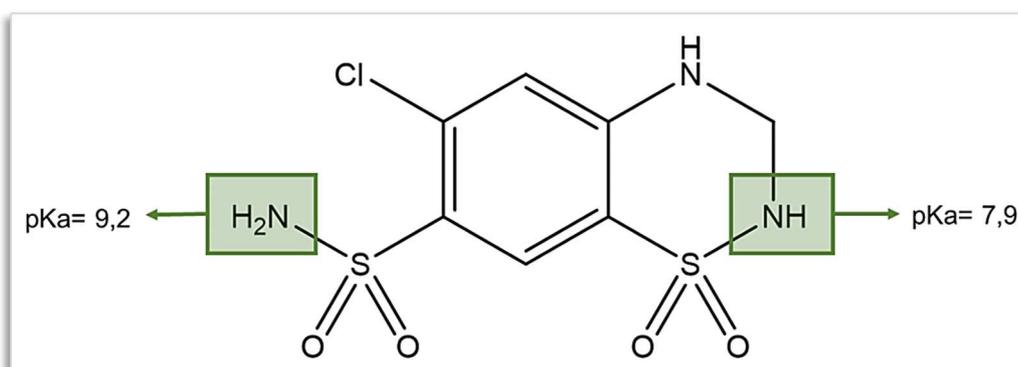


Figura 2.2: Hidroclorotiazida.

La HCT es un fármaco poco soluble en agua y poco permeable a través de la mucosa intestinal, por lo tanto, pertenece a la clase IV del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (Amidon y col., 1995).

La HCT es una molécula polifuncional con valores de pKa de 7,9 y 9,2. Debido a esto, es que a pH < 6 está en su estado neutro, mientras que a valores de pH > 9 es un di-anión. En el rango de pH fisiológicos, se encuentra como una mezcla de especies neutra, mono-aniónica y di-aniónica (Čudina y col., 2005).

➤ **Sistema de Clasificación Biofarmacéutico**

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico de fármacos (SCB), propuesto por el Dr. Gordon Amidon (Amidon y col., 1995), es un marco científico para clasificar un fármaco considerando su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal. Además, el SCB tiene en cuenta la disolución del fármaco, por lo cual considera los tres factores más importantes que modulan la velocidad y cantidad absorbida de un principio activo, a partir de formas farmacéuticas sólidas de administración oral y de liberación inmediata. En base a esto, los fármacos se pueden clasificar en cuatro categorías, tal como se muestra en la tabla 2.1.

Tabla 2.1: Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.

| Clase | Solubilidad | Permeabilidad |
|--------------|--------------------|----------------------|
| I | Alta | Alta |
| II | Baja | Alta |
| III | Alta | Baja |
| IV | Baja | Baja |

La solubilidad y la velocidad de disolución de un ingrediente activo son las características de mayor importancia en los estudios de preformulación de formas de dosificación farmacéutica sólidas (Zakeri-Milani y col., 2009). Son muchos los factores que influyen la velocidad y cantidad de un ingrediente farmacológicamente activo que se absorbe luego de su administración oral. Las propiedades fisicoquímicas de los fármacos son quizás las más importantes. La absorción también puede ser muy afectada por la presencia de otros materiales

en el tracto gastrointestinal (TGI) (ej.: vehículo usado en el experimento, comida ingerida antes o durante la ingestión del agente terapéutico, etc.).

Las guías de la Food and Drug Administration (FDA)(FDA, 2000), establecen que una sustancia se considera altamente soluble cuando la mayor dosis de la misma se solubiliza en 250 mL o menos de agua en el intervalo de pH 1,0 – 7,5. El volumen estimado de 250 mL deriva de los protocolos básicos de bioequivalencia donde se prescribe la administración de los fármacos con un vaso de agua. El rango de pH establecido se debe a que en condiciones de ayuno, el pH a lo largo del TGI varía en un rango de 1,4 – 7,4, desde el estómago hasta el íleon. De lo contrario, las sustancias se consideran poco solubles (FDA, 2001). A su vez, las guías de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Europea de Medicina (EMA) consideran a una sustancia altamente soluble cuando presenta la menor relación dosis/solubilidad en 250 mL, a 37 °C en el intervalo de pH 1,2 – 6,8 (EMA, 2010; OMS, 2006). Una alta solubilidad asegura que dicha propiedad no afectará la disolución y la consecuente absorción de las moléculas del fármaco.

Por su parte, las guías de la FDA establecen que, ante la ausencia de inestabilidad en el TGI, una sustancia se considera altamente permeable cuando la cantidad absorbida en el intestino resulta del 90% o más; de otro modo los fármacos se consideran poco permeables (FDA, 2001). Por otro lado, las guías de la OMS y la EMA establecen que una sustancia se considera altamente permeable cuando la cantidad absorbida es del 85% o más (EMA, 2010; OMS, 2006). Una alta permeabilidad asegura que un fármaco será completamente absorbido durante el tiempo limitado de tránsito por el intestino delgado.

➤ Objetivos

El objetivo planteado para esta parte del proyecto de tesis, fue mejorar las propiedades biofarmacéuticas desfavorables de la HCT, utilizando como estrategia la formación de complejos de inclusión con CDs. Para trabajar se seleccionó la β CD, ya que es la favorita para la encapsulación de fármacos en la industria farmacéutica, por su bajo costo y alto rango de productividad (Sun y col., 2006).

El complejo fue exhaustivamente caracterizado, por medio de diversas técnicas, tanto en estado sólido como en solución, y así también con métodos *in silico*.

Para alcanzar el objetivo propuesto se desarrolló la siguiente metodología de trabajo:

Parte I: Caracterización en Solución

Se realizó la caracterización en estado líquido del complejo formado, para poder determinar la estequiometría del mismo, las interacciones establecidas entre el IFA y el receptor, el porcentaje de encapsulación de IFA en el complejo y el efecto de la acomplejación en la solubilidad y estabilidad de este principio activo.

Con este fin, se han llevado a cabo estudios de Diagramas de Solubilidad de Fases, Titulación Isotérmica Calorimétrica y Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear, abarcando diferentes valores de pH 3; 5,5; 6,8; 7,4; 8 y 10; los cuales simularon las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal y en un amplio rango de temperaturas (20 – 45 °C).

Parte II: Caracterización en Estado Sólido.

La caracterización en estado sólido se llevó a cabo con el fin de determinar qué tipo de interacciones tienen lugar entre los componentes de los sistemas obtenidos, qué grupos funcionales se ven involucrados en dicho proceso, cómo se ven afectadas las propiedades fisicoquímicas del IFA en la nueva entidad formada y cómo se modifica la velocidad de disolución del principio activo, como dato fundamental de este trabajo.

Para esto, se realizaron análisis térmicos, espectros infrarrojos y ensayos de disolución, analizando muestras de los componentes puros, las mezclas físicas y el complejo obtenido por liofilizado.

Parte III: Estudios Computacionales

Los estudios teóricos de modelado molecular se realizaron para predecir el comportamiento del complejo de inclusión obtenido. Los resultados experimentales se compararon con los cálculos teóricos. El objetivo de este

estudio fue correlacionar los resultados experimentalmente con los que se obtuvieron por medio de métodos computacionales.

➤ **Materiales**

La HTC, fue comprada a Parafarm (Buenos Aires, Argentina) y se utilizó sin previa purificación.

La β CD, fue donada por Ferromet S.A. (agente de Roquette en Argentina).

El agua deuterada (D_2O) 99,9% D, utilizada para los estudios de NMR fue adquirida en Sigma (Buenos Aires, Argentina).

Todos los experimentos fueron realizados con químicos de grado analítico.

El agua utilizada en todos los estudios fue producida con un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). Se utilizaron buffer fosfatos para controlar el valor del pH del medio.

PARTE I: CARACTERIZACIÓN EN SOLUCIÓN

2.1.1 Instrumental

Las muestras se pesaron en una balanza analítica Voyager Ohaus modelo Explorer E01140. Se solubilizaron con la ayuda de un ultrasonicador Elma S 40 Elmasonic y se incubaron en un baño termostatzado HAAKE DC10 con una precisión de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

El pH de las muestras se determinó utilizando un pH-metro Hanna instrument HI 255 combined meter.

Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis. Se emplearon celdas de cuarzo de 1cm de paso óptico Hèllma Analytics.

Los estudios de ITC se realizaron utilizando un titulador VP-ITC Microcalorímetro (MicroCal, Inc., Northampton, MA)

Los espectros de NMR fueron obtenidos usando un espectrómetro Bruker Avance II 400 de alta resolución, equipado con resolución digital, sonda de detección inversa y unidad de temperatura variable. El equipo operó a 400,16 MHz para ^1H y a 100,63 para ^{13}C . Se utilizaron tubos de 5 mm de diámetro Merck®. Todos los experimentos se desarrollaron en solución tamponadas en D_2O .

2.1.2 Métodos

2.1.2.1 Diagrama de Solubilidad de Fases

Los diagramas de solubilidad (DSF) se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Higuchi y Connors (Higuchi, 1965). Un exceso de HCT se mezcló con soluciones tamponadas de diferentes valores de pH (3; 5,5; 6,8; 7,4; 8 y 10), conteniendo cantidades crecientes de βCD (0 – 12 mM). Los tubos se colocaron en un baño termostatzado a diferentes temperaturas (25, 37 y 45 $^{\circ}\text{C}$) durante 72 h, para alcanzar las condiciones del equilibrio. Dos veces al día, los tubos fueron sometidos a mezclado por vortex, para favorecer aún más la solubilidad de la

HCT. Una vez alcanzado el equilibrio de fases, las muestras fueron filtradas a través de filtros de membranas de tamaño de poro de 0,45 μm . Se midió el pH de las soluciones obtenidas y, luego de hacer las diluciones correspondientes, se cuantificó la cantidad de HCT solubilizada, con un espectrofotómetro UV-Vis a 270 nm; la βCD no tiene absorbancia a la longitud de onda (λ) seleccionada.

Los DSF fases se construyeron graficando la concentración de soluto medido en función de la concentración del ligando en cada solución; en donde S_0 representa la solubilidad en equilibrio del soluto en ausencia del ligando. Las constantes de estabilidad aparente (K , M^{-1}) se obtuvieron aplicando la ecuación 2.1.

$$K = \text{pendiente} / (S_0 (1 - \text{pendiente})) \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Cada experimento se realizó por triplicado, informándose cada valor, con el error correspondiente (\pm DS).

2.1.2.2 Titulación Isotérmica Calorimétrica

Los experimentos de titulación isotérmica calorimétrica (ITC) se realizaron a 20, 25, 37 y 45 $^{\circ}\text{C}$, utilizando un microcalorímetro. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando la concentración de máxima solubilidad, tanto para la HCT como para la βCD , por lo cual la concentración inicial del huésped (HCT) fue de 2 mM, dentro de la celda de titulación; mientras que la solución inicial del receptor (βCD), en la jeringa de infusión, fue de 12 mM. Esta estrategia de colocar el huésped en la celda de titulación y titular con el ligando, se utiliza cuando el fármaco en estudio tiene baja solubilidad (Illapakurthy y col., 2005).

Para cada experimento, se agregaron 28 alícuotas de 10 μL cada una de solución de βCD , para titular la solución de HCT dentro de la celda de reacción (1,4542 mL). Ambas soluciones se encontraban al mismo valor de pH (3; 5,5; 6,8; 7,4; 8 y 10). Las alícuotas fueron agregadas a intervalos de 3,3 minutos, tiempo suficiente para permitir que se equilibren las soluciones dentro de la celda. Antes de cada ensayo de formación de complejo realizado, se midió el calor liberado durante la reacción de dilución de la βCD , titulado con 28 inyecciones (10 μL cada una) en la solución tamponada correspondiente al del

ensayo, utilizándose este valor como blanco a la hora de calcular las constantes de estabilidad.

Durante el experimento y como consecuencia de la dilución de la muestra en la celda de titulación, la concentración del huésped varió de 2 a 1,67 mM, mientras que la concentración del receptor estuvo en un rango de 0 a 2 mM. Todas las soluciones fueron desgasificadas antes de comenzar las titulaciones.

Los datos obtenidos de los experimentos fueron procesados luego de ser convertidos en isothermas de unión. Antes de ajustar al modelo apropiado, se descontó la isoterma de calor de dilución de la β CD a la isoterma correspondiente al calor de unión. La primera inyección (5 μ L) se descartó para evitar cualquier efecto de difusión entre los materiales de la jeringa y la celda calorimétrica.

Cada experimento fue realizado por triplicado para asegurar la reproducibilidad, los datos obtenidos de las réplicas exhibieron diferencias menores al 10%. Las entalpías de unión (ΔH , $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), estequiometría (n) y constantes de estabilidad (K , M^{-1}) fueron obtenidas por un modelo de ajuste no lineal, utilizando el software propio del equipo MicroCal Origin.

Los ensayos de ITC se llevaron a cabo en colaboración con la Dra. Mariana A. Fernández, investigadora del INFIQC-CONICET, en el departamento de Química Orgánica, de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

2.1.2.3 Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de NMR de protones (^1H NMR) fueron realizados a 25 y 45°C en soluciones tamponadas (0,2 M)/ D_2O (80/20 %v/v), ajustando el valor de pH a 3; 5,5; 6,8; 7,4; 8; 8,7; 9,5; 10 y 12, con NaOH o D_2O . El corrimiento químico (δ) del solvente residual a 4,8 ppm se utilizó como referencia interna. Debido a su baja solubilidad en agua, las soluciones de HCT o HCT más β CD se prepararon de la siguiente manera: se colocó un exceso de HCT en 5 mL de una solución acuosa de β CD (12 mM) en una solución tamponada de fosfatos (0,2 M)/ D_2O o D_2O , los cuales se agitaron por 24 h a 25 °C. La suspensión resultante se filtró antes de realizar los espectros de ^1H NMR. La variación de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) de protones para la β CD y la HCT, originados por el fenómeno de acomplejamiento, se calculó aplicando la ecuación 2.2.

$$\Delta\delta = \delta_{ac} - \delta_{libre}$$

Ecuación 2.2

donde, δ_{ac} es el corrimiento de los protones de la β CD ó la HCT cuando están acomplejadas y δ_{libre} , es el corrimiento de los protones de la β CD ó la HCT cuando están solas.

2.1.2.4 Análisis Estadístico de los Datos

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el test- t de Student. En este test, se rechaza la hipótesis nula (H_0) cuando $p \leq 0$ al nivel de significación elegido. Es decir si se trabaja con un 95% de confianza, $p= 0,05$. H_0 plantea que no hay diferencia entre las muestras comparadas. Por lo tanto, se considera que una diferencia es estadísticamente significativa cuando se cumple que p es $\leq 0,05$; siendo p la probabilidad.

2.1.3 Resultados y Discusión

2.1.3.1 Diagramas de Solubilidad de Fases

Los DSF son herramientas muy útiles para el estudio de complejos de inclusión entre componentes poco solubles en agua y las CDs. Si bien no verifican la formación del complejo de inclusión, nos permiten describir como aumenta la solubilidad del IFA a medida que aumenta la concentración del receptor (CD).

Higuchi y Connors, proponen una clasificación de los complejos basándose en sus diagramas de solubilidad de fases; por ejemplo, cómo cambia la solubilidad aparente de una molécula de soluto (IFA) cuando aumenta la concentración del ligando disuelto (CD), debido a que aumenta la solubilidad acuosa del IFA por el complejo formado (Higuchi, 1965).

Como se mencionó anteriormente, los DSF se construyen graficando la concentración del soluto en función de la concentración del ligando en solución;

de los cuales se obtienen diagramas de dos clases, de tipo A y de tipo B, con algunas variaciones dentro de cada una de ellas.

En soluciones acuosas, los perfiles de solubilidad de fase tipo A se obtienen cuando la solubilidad del soluto aumenta con el incremento en la concentración del ligando, a través de la formación de complejos solubles en agua. Cuando el complejo es de primer orden con respecto al soluto y de primer orden con respecto al ligando, entonces estamos en presencia de perfiles del tipo A_L . Si el complejo es de primer orden con respecto al soluto pero de segundo orden o mayor con respecto al ligando, tenemos perfiles del tipo A_P . Los perfiles del tipo A_N son muy difíciles de interpretar, probablemente respondan a cambios en la constante dieléctrica inducidos por el ligando en el medio acuoso de acomplejamiento, a cambios en la solubilidad del complejo o la agregación de las moléculas de ligando. Los DSF tipo B indican la formación de complejo con limitada solubilidad en el medio acuoso de acomplejamiento. Los complejos más comúnmente formados, entre los IFA y las CD, son del tipo 1:1 (Messner y col., 2010). En la figura 2.3 se muestra un esquema con de los distintos tipos de DSF.

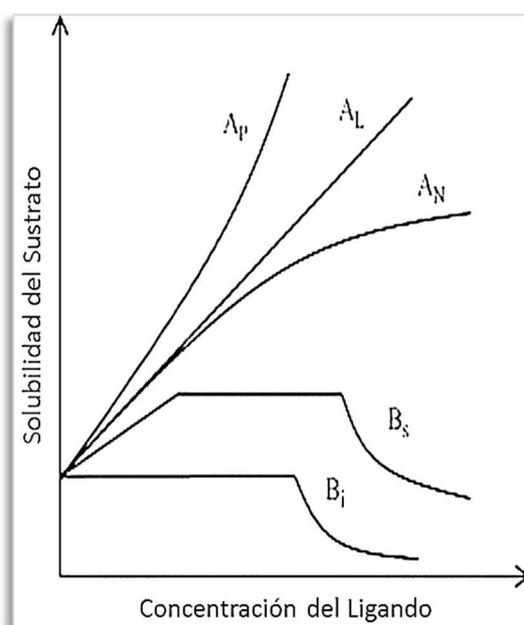


Figura 2.3: Tipos de diagramas de solubilidad de fases.

Considerando las isotermas de tipo A, se supone que un complejo simple de tipo S_mL_n , es el responsable del aumento de la solubilidad aparente de S , por lo que la constante de formación del mismo va a estar dada por la ecuación 2.3.

$$K = \frac{[S_m L_n]}{[S]^m [L]^n} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

en donde, $[S_m L_n]$ es la concentración molar del complejo, $[S]$ es la concentración molar del soluto y $[L]$ la concentración molar del ligando.

Las concentraciones de cada especie pueden expresarse como:

$$[S] = S_0 \quad \text{Ecuación 2.4}$$

$$[S_m L_n] = \frac{S_t - S_0}{m} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

$$[L] = L_t - n[S_m L_n] \quad \text{Ecuación 2.6}$$

en donde, S_0 es la solubilidad de S en el equilibrio en ausencia de L , S_t es la concentración total disuelta de S , y L_t es la concentración total adicionada de L .

Un gráfico de S_t vs L_t para la formación de un complejo soluble $S_m L_n$ resulta en una línea recta (diagrama tipo A), en el cual la intersección al eje y es igual a S_0 y de la pendiente obtenemos la K según la fórmula de la ecuación 2.1.

En la figura 2.4, se presentan los gráficos correspondientes a los DSF determinados para la HCT con la β CD en soluciones acuosas de diversos valores de pH y a diferentes temperaturas: a) 25 °C, b) 37 °C y c) 45 °C. En todos los casos, la solubilidad de la HCT aumentó linealmente con respecto al aumento en la concentración de la β CD. Se propone entonces, la formación de un complejo HCT/ β CD de estequiometría 1:1, soluble en el rango de concentraciones estudiadas, lo cual está definido por el diagrama de solubilidad del tipo A_L. La constante de estabilidad, de estequiometría 1:1 ($K_{1:1}$, M⁻¹), del complejo de inclusión se calculó a partir del ajuste lineal de la curva, utilizando la ecuación 2.1 a diferentes valores de pH y temperatura. Los resultados se presentan en la tabla 2.2.

De los resultados obtenidos se observó que la K fue altamente dependiente del estado de ionización de la HCT; siendo los valores más bajos de $K_{1:1}$ a altos

valores de pH, indicando que cuando la HCT está totalmente ionizada tiene baja afinidad por la β CD; lo que podría atribuirse a las características básicas de esta molécula, ya que debido a esto decrece la hidrofobicidad de la HCT, lo cual podría afectar a las interacciones de Van der Waals y a su vez, aumentar la energía de desolvatación del ligando requerida para que se forme el complejo.

También se observó que el valor de la K disminuye a medida que aumenta la temperatura, ya que en esas condiciones el complejo formado es más inestable. La cantidad encapsulada de HCT en la cavidad de la β CD fue en promedio del (28 ± 7) %.

En base a los resultados expuestos, se observó que el valor de la K es altamente dependiente del pH del medio, por lo tanto del estado de ionización del fármaco y, de la temperatura.

Tabla 2.2: Resultados de los DSF en las distintas condiciones ensayadas.

| Medio | T °C | S ₀ (M) | S _{máx} (M) | Tipo de curva | K _{1:1} (M ⁻¹) | r ² | %Encapsulado |
|---------|------|---------------------------------|---------------------------------|----------------|-------------------------------------|----------------|--------------|
| pH= 3 | 25 | (1,76 ± 0,05) x10 ⁻³ | (3,98 ± 0,13) x10 ⁻³ | A _L | 123 ± 5 | 0,9963 | 21,7 |
| | 37 | (2,08 ± 0,07) x10 ⁻³ | (4,36 ± 0,12) x10 ⁻³ | A _L | 114 ± 6 | 0,9947 | 23,7 |
| | 45 | (3,38 ± 0,39) x10 ⁻³ | (5,02 ± 0,17) x10 ⁻³ | A _L | 42 ± 8 | 0,8976 | 14,2 |
| pH= 5,5 | 25 | (1,79 ± 0,03) x10 ⁻³ | (3,48 ± 0,11) x10 ⁻³ | A _L | 126 ± 16 | 0,9778 | 22,5 |
| | 37 | (2,96 ± 0,13) x10 ⁻³ | (5,11 ± 0,17) x10 ⁻³ | A _L | 76 ± 12 | 0,9525 | 22,1 |
| | 45 | (3,79 ± 0,11) x10 ⁻³ | (6,85 ± 0,24) x10 ⁻³ | A _L | 76 ± 8 | 0,9738 | 28,8 |
| pH= 6,8 | 25 | (2,18 ± 0,06) x10 ⁻³ | (4,19 ± 0,01) x10 ⁻³ | A _L | 130 ± 15 | 0,9818 | 28,3 |
| | 37 | (3,82 ± 0,14) x10 ⁻³ | (6,46 ± 0,22) x10 ⁻³ | A _L | 71 ± 13 | 0,9426 | 27,1 |
| | 45 | (4,25 ± 0,29) x10 ⁻³ | (7,12 ± 0,14) x10 ⁻³ | A _L | 77 ± 7 | 0,9730 | 32,7 |
| pH= 7,4 | 25 | (2,17 ± 0,04) x10 ⁻³ | (4,77 ± 0,18) x10 ⁻³ | A _L | 111 ± 29 | 0,8807 | 24,1 |
| | 37 | (3,21 ± 0,07) x10 ⁻³ | (4,89 ± 0,15) x10 ⁻³ | A _L | 86 ± 17 | 0,8266 | 27,5 |
| | 45 | (4,77 ± 0,29) x10 ⁻³ | (6,30 ± 0,26) x10 ⁻³ | A _L | 75 ± 11 | 0,9512 | 35,8 |
| pH= 8 | 25 | (2,94 ± 0,11) x10 ⁻³ | (5,40 ± 0,19) x10 ⁻³ | A _L | 82 ± 7 | 0,9859 | 24,1 |
| | 37 | (4,15 ± 0,05) x10 ⁻³ | (6,69 ± 0,07) x10 ⁻³ | A _L | 69 ± 9 | 0,9390 | 28,6 |
| | 45 | (5,21 ± 0,12) x10 ⁻³ | (8,66 ± 0,42) x10 ⁻³ | A _L | 80 ± 8 | 0,9740 | 41,7 |
| pH= 10 | 25 | (1,32 ± 0,01) x10 ⁻² | (1,64 ± 0,06) x10 ⁻² | A _L | 25 ± 5 | 0,8784 | 33,1 |
| | 37 | (2,01 ± 0,04) x10 ⁻² | (2,60 ± 0,12) x10 ⁻² | A _L | 19 ± 2 | 0,9497 | 38,2 |
| | 45 | (2,15 ± 0,16) x10 ⁻² | (2,65 ± 0,12) x10 ⁻² | A _L | 36 ± 5 | 0,9334 | 77,4 |

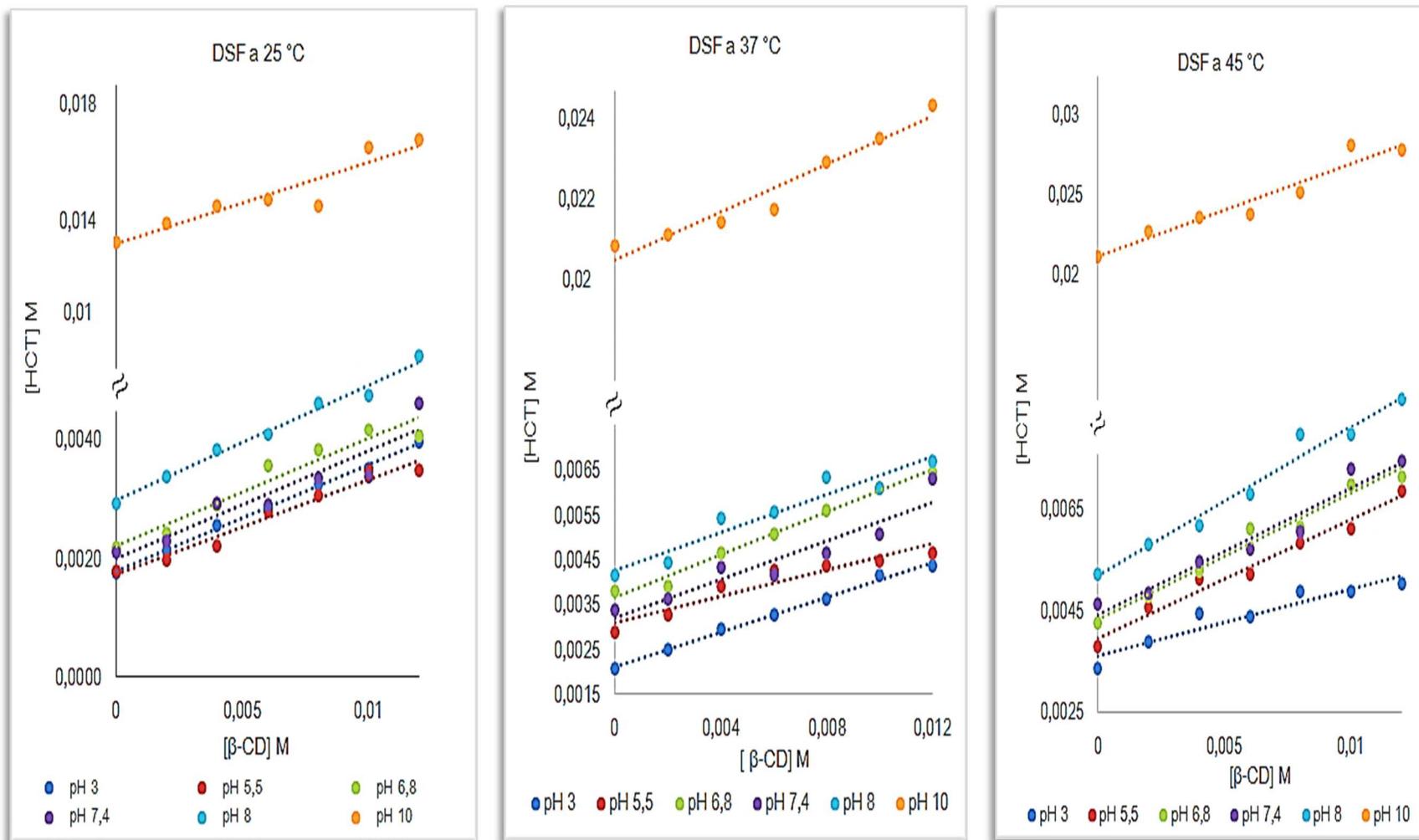


Figura 2.4: DSF a distintos valores de pH y temperaturas, $[\text{HCT}]$ M vs $[\beta\text{CD}]$ M. a) 25 °C; b) 37 °C; c) 45 °C.

2.1.3.2 Titulación Isotérmica Calorimétrica

La técnica de ITC es muy valiosa y altamente sensible, capaz de medir la interacción de especies reactivas en solución. Hasta ahora se ha utilizado con gran éxito en estudios de interacción desde el punto de vista termodinámico y cinético, entre biomoléculas, ambas en soluciones acuosas diluidas.

Los desarrollos instrumentales recientes para calorimetría, permiten la detección de interacciones muy débiles que involucran calores de unión muy bajos, del orden de micro-joules. Esto convierte la técnica en una herramienta adecuada para evaluar las interacciones asociadas a los complejos con CD (Sun y col., 2006). De esta manera, pueden determinarse simultáneamente la constante de estabilidad (K), la estequiometría del complejo (n), la entalpía (H) y la entropía (S), obteniendo el perfil termodinámico completo de la interacción de un determinado compuesto con la CD, utilizando un ajuste no lineal de cuadrados mínimos basados en la isoterma de Wiseman, ecuación 2.7

Para el caso más simple de unión ligando – receptor ($X+M$) de estequiometría 1:1, dicha isoterma de Wiseman (ecuación 2.7), se relaciona paso a paso con los cambios de calor del sistema (normalizado con respecto a los moles de ligando agregados por inyección ($dQ/d[X]_t$) con la relación absoluta de concentraciones ligando – receptor ($X_R = [X]_t/[M]_t$), en todos los puntos de la curva de titulación. Los parámetros ΔH , V_0 y r son la entalpía molar de unión, el volumen efectivo de la solución de la celda de titulación y la composición variable $1/[CD]TK_{eq}$ (ecuación 2.8), respectivamente. (Turnbull y col., 2003) (Indyk y col., 1998).

$$\frac{dQ}{d[X]_t} = \Delta H V_0 \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - X_R - r}{2 \sqrt{(1 + X_R - r)^2 - 4X_R}} \right] \quad \text{Ecuación 2.7}$$

donde,

$$\frac{1}{r} = c = K_a [M]_t = \frac{[M]_t}{K_d} \quad \text{Ecuación 2.8}$$

Aplicando las ecuaciones 2.9 y 2.10, es posible calcular la energía libre y los parámetros de entropía.

$$\Delta G = -RT \ln K \quad \text{Ecuación 2.9}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Ecuación 2.10}$$

En el gráfico de la figura 2.5, se muestra una curva representativa del calor liberado en función de la relación molar HCT: β CD, para una solución de HCT titulada con una solución de β CD.

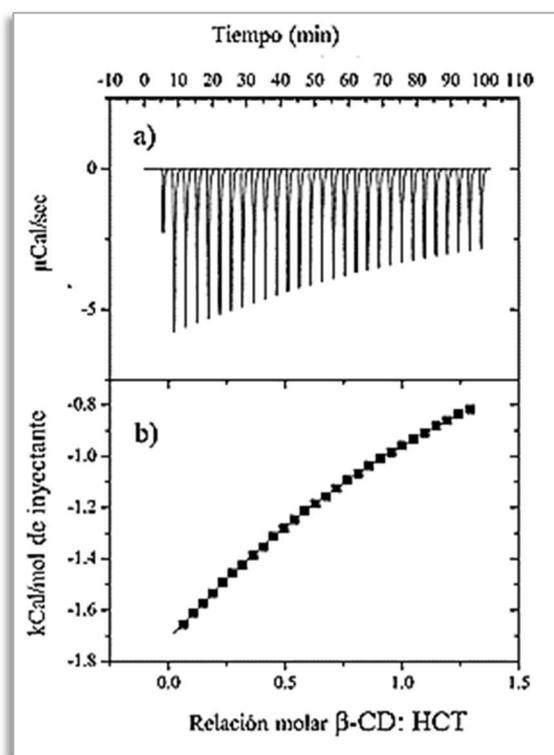


Figura 2.5: Gráfico de la curva de liberación de calor durante la titulación de HCT con β CD. a) Titulación isotérmica calorimétrica. b) Isotherma de titulación.

La forma aparente de la curva de titulación obtenida, en los experimentos de ITC, varió significativamente, dependiendo de la concentración del ligando (HCT) y del receptor (β CD), así como de la magnitud de la constante de equilibrio. Si la constante de equilibrio es pequeña y la concentración del ligando inicial es baja, solamente una pequeña porción del receptor agregado puede reaccionar con el ligando en la celda para dar una curva típica (sigmoidea completa) (H. Dodziuk,

2006). Es por esta razón que en estos casos, sólo vemos la primera parte de dicha curva.

Para poder determinar el tipo de interacción que mejor ajusta a los datos experimentales, se evaluaron los modelos de un sitio y de uniones secuenciales, con n , K y H como parámetros representativos ajustables. Ambos modelos corresponden a las reacciones indicadas en las ecuaciones 2.11 y 2.12, las cuales son designadas por el programa como “*single-site model*” y “*sequential binding model*”, respectivamente.



El mejor ajuste se obtuvo con el modelo de “*single-site model*”, los resultados se presentan en la tabla 2.3.

En todos los casos se observó que se forma un complejo de inclusión de estequiometría 1:1, por medio de una reacción exotérmica. De los parámetros termodinámicos calculados, se pudo ver que la disminución de la energía libre de Gibbs (ΔG), asociada a la formación del complejo de inclusión, estuvo impulsada principalmente por la entalpía. Este fenómeno exotérmico se relacionó con las interacciones intermoleculares que se establecieron entre la HCT y la β CD luego del acomplejamiento y resultó en ambos eventos termodinámicos, favorables y desfavorables. Se sabe que las interacciones de van de Waals constituyen un componente clave que impulsa la formación de complejos de inclusión con la β CD, por lo que se esperaría que la HCT posicione la parte más hidrofóbica de la molécula dentro de la cavidad de la CD, mientras que los restos más polares, estén expuestos al solvente. También se conoce que la deshidratación de la β CD juega un papel importante en la inclusión de HCT, el costo energético de este evento también se observó en el cambio de entalpía. Considerando que la unión de HCT tiene valores de ΔG negativos, se esperaría que la estabilización del complejo, conferida por la fuerza de van der Waals y las interacciones electrostáticas, sea compensada por el costo energético de la deshidratación de la β CD.

El cambio entálpico asociado a la formación del complejo fue altamente dependiente de los estados de ionización de la HCT y de la temperatura, siendo que los valores más pequeños fueron obtenidos en los altos estados de ionización del fármaco y temperaturas, esto sugeriría que las interacciones intermoleculares entre la HCT, y así la estructura del complejo, sea altamente modificado por estas variables. Esta observación es consistente con lo observado por otros autores (Terekhova y col., 2015; Zielenkiewicz y col., 2010), donde un ligando con una carga neta, exhibe menores constantes de afinidad por la β CD que su correspondiente equivalente neutro. La identificación a nivel atómico de este fenómeno, será ampliamente discutido en la parte de estudios de modelado molecular.

Con respecto a los cambios de entropía (ΔS), se han encontrado valores negativos pequeños, los cuales se atribuyeron a los rearrreglos conformacionales y a la desolvatación asociada con la formación del complejo. Puede ser que, en la formación del complejo, las moléculas de agua son excluidas de la cavidad de la β CD y de la interfaz de unión, lo cual origina una significativa reacomodación del solvente. Los cambios de entropía negativa observados, podrían ser originados por la ganancia entrópica derivada de los rearrreglos de las moléculas de agua originalmente alrededor de las moléculas del ligando y del receptor, la pérdida de entropía del ligando, está relacionada con la disminución en la libertad de movimiento dentro del complejo. Como estos efectos opuestos fueron casi iguales, la variación de la entropía fue baja y, en este caso particular, ligeramente negativa. El efecto de la temperatura en la afinidad de HCT por β CD también fue analizado, observándose que la afinidad disminuye a medida que aumenta la temperatura, lo cual confirma que el proceso es exotérmico.

Tabla 2.3: Resultados obtenidos por ITC para el complejo formado HCT/ β CD, en soluciones tamponadas de diferente valor de pH y a distintas temperaturas: parámetros termodinámicos ΔH° , ΔG° y ΔS° , y constante de estabilidad, K .

| Medio | T °C | $K_{1:1}$ (M ⁻¹) | Estequiometría | ΔH | ΔG | ΔS |
|----------|------|------------------------------|----------------|------------------------|------------------------|---|
| | | | | kJ x mol ⁻¹ | kJ x mol ⁻¹ | J x mol ⁻¹ x K ⁻¹ |
| pH = 3 | 20 | 158 ± 1 | 1:1 | - 7085 ± 40 | -2954 | -14,1 |
| | 25 | 110 ± 1 | 1:1 | -7837 ± 61 | -2771 | -17,0 |
| | 37 | 79 ± 1 | 1:1 | -6992 ± 55 | -2652 | -13,9 |
| | 45 | 70 ± 1 | 1:1 | -5867 ± 97 | -2687 | -10,0 |
| pH = 5,5 | 20 | 168 ± 2 | 1:1 | -6122 ± 51 | -4074 | -6,4 |
| | 25 | 115 ± 1 | 1:1 | -7686 ± 48 | -2421 | -16,3 |
| | 37 | 76 ± 1 | 1:1 | -7001 ± 87 | -2311 | -14,0 |
| | 45 | 77 ± 2 | 1:1 | -5224 ± 123 | -2555 | -7,8 |
| pH = 6,8 | 20 | 121 ± 1 | 1:1 | -8479 ± 72 | -2310 | -19,4 |
| | 25 | 128 ± 1 | 1:1 | -6536 ± 12 | -2563 | -12,3 |
| | 37 | 94 ± 3 | 1:1 | -5612 ± 127 | -2577 | -9,1 |
| | 45 | 94 ± 8 | 1:1 | -3789 ± 93 | -2801 | -2,9 |
| pH = 7,4 | 20 | 127 ± 2 | 1:1 | -9153 ± 96 | -2284 | -21,6 |
| | 25 | 120 ± 1 | 1:1 | -6966 ± 41 | -2509 | -13,8 |
| | 37 | 107 ± 3 | 1:1 | -5576 ± 114 | -2665 | -8,7 |
| | 45 | 89 ± 2 | 1:1 | -4933 ± 85 | -2673 | -6,6 |
| pH = 8 | 20 | 117 ± 1 | 1:1 | -7527 ± 52 | -2375 | -16,2 |
| | 25 | 111 ± 3 | 1:1 | -7997 ± 183 | -2345 | -17,5 |
| | 37 | 68 ± 2 | 1:1 | -4594 ± 84 | -2440 | -6,4 |
| | 45 | 81 ± 4 | 1:1 | -4581 ± 65 | -2640 | -5,7 |
| pH = 10 | 20 | 76 ± 2 | 1:1 | -3056 ± 64 | -2480 | -1,8 |
| | 25 | 38 ± 1 | 1:1 | -7947 ± 245 | -1681 | -19,4 |
| | 37 | 26 ± 1 | 1:1 | -6836 ± 340 | -1610 | -15,6 |
| | 45 | 43 ± 7 | 1:1 | -2361 ± 325 | -2386 | 0,1 |

2.1.3.3 Resonancia Magnética Nuclear

La técnica de ^1H NMR permite estudiar el ambiente individual de cada núcleo atómico por medio de la cuantificación de la variación en los corrimientos químicos de varias señales de protones y de esta manera, establecer interferencias relevantes con respecto al modo de inclusión del ligando. La inclusión de la HCT en la cavidad de la βCD se evaluó por mediciones en los cambios de corrimientos químicos ($\Delta\delta$) de los protones en el complejo, relativos a los componentes libres HCT y βCD , a diferentes valores de pH (3 – 12) y de temperatura (25 – 45 °C). En las tablas 2.4 y 2.5 se muestran las asignaciones de los corrimientos de los protones de βCD y de HCT puras y, el corrimiento debido al acomplejamiento. En la figura 2.6 se establece la numeración de los protones de cada una de las moléculas.

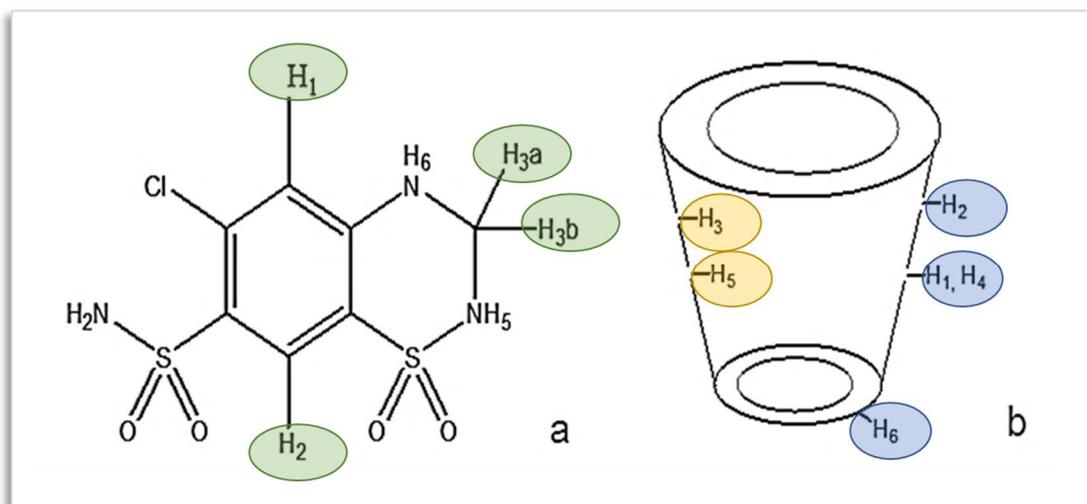


Figura 2.6: Designación de protones. a) HCT (verde). b) βCD , protones internos (amarillo), protones externos (azul).

Tabla 2.4: Valores de desplazamiento químico de los protones de la HCT, libre y acomplejada. Diferencias de corrimiento químico debido a la formación del complejo de inclusión con la β CD a 25 y 45 °C.

| Medio | 25 °C | | | | 45 °C | | |
|----------|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | HCT | H ₁ | H ₂ | H ₃ | H ₁ | H ₂ | H ₃ |
| pH = 3 | δ (libre) | 8,478 | 7,329 | 5,091 | 8,478 | 7,329 | 5,091 |
| | δ (acomplejada) | 8,447 | 7,316 | 5,102 | 8,447 | 7,316 | 5,102 |
| | $\Delta\delta$ | -0,031 | -0,013 | 0,011 | -0,031 | -0,013 | 0,011 |
| pH = 5,5 | δ (libre) | 8,424 | 7,276 | - | 8,424 | 7,276 | - |
| | δ (acomplejada) | 8,468 | 7,336 | - | 8,468 | 7,336 | - |
| | $\Delta\delta$ | 0,045 | 0,060 | - | 0,045 | 0,060 | - |
| pH = 7,4 | δ (libre) | 8,415 | 7,274 | 5,036 | 8,415 | 7,274 | 5,036 |
| | δ (acomplejada) | 8,442 | 7,313 | 5,094 | 8,442 | 7,313 | 5,094 |
| | $\Delta\delta$ | 0,027 | 0,039 | 0,058 | 0,027 | 0,039 | 0,058 |
| pH = 8 | δ (libre) | 8,254 | 7,098 | - | 8,273 | 7,118 | - |
| | δ (acomplejada) | 8,214 | 7,081 | - | 8,433 | 7,073 | - |
| | $\Delta\delta$ | 0,04 | -0,017 | - | 0,160 | 0,185 | - |
| pH = 8,7 | δ (libre) | 8,396 | 7,253 | 5,034 | 8,396 | 7,253 | 5,034 |
| | δ (acomplejada) | 8,389 | 7,256 | 5,050 | 8,389 | 7,256 | 5,050 |
| | $\Delta\delta$ | -0,006 | 0,003 | 0,016 | -0,006 | 0,003 | 0,016 |
| pH = 9,5 | δ (libre) | 8,338 | 7,193 | 4,989 | 8,338 | 7,193 | 4,989 |
| | δ (acomplejada) | 8,345 | 7,202 | 5,006 | 8,345 | 7,202 | 5,006 |
| | $\Delta\delta$ | 0,007 | 0,010 | 0,017 | 0,007 | 0,010 | 0,017 |
| pH = 10 | δ (libre) | 8,259 | 7,112 | 4,914 | 8,259 | 7,112 | 4,914 |
| | δ (acomplejada) | 8,318 | 7,167 | 4,978 | 8,318 | 7,167 | 4,978 |
| | $\Delta\delta$ | 0,059 | 0,055 | 0,065 | 0,059 | 0,055 | 0,065 |
| pH = 12 | δ (libre) | 8,307 | 7,155 | 4,962 | 8,307 | 7,155 | 4,962 |
| | δ (acomplejada) | 8,325 | 7,174 | 4,985 | 8,325 | 7,174 | 4,985 |
| | $\Delta\delta$ | 0,017 | 0,019 | 0,023 | 0,017 | 0,019 | 0,023 |

Tabla 2.5 Valores de desplazamiento químico de los protones de la β CD, libre y acomplejada. Diferencias de corrimiento químico debido a la formación del complejo de inclusión con la HCT a 25 y 45 °C.

| | | 25°C | | | | | | 45°C | | | | | |
|----------|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Medio | β CD | H ₁ | H ₂ | H ₃ | H ₄ | H ₅ | H ₆ | H ₁ | H ₂ | H ₃ | H ₄ | H ₅ | H ₆ |
| pH = 3 | δ (libre) | 5,058 | 3,642 | 3,956 | 3,570 | 3,840 | 3,869 | 52,989 | 38,810 | 41,824 | 38,014 | 40,681 | 41,065 |
| | δ (complejo) | 5,068 | 3,655 | 3,959 | 3,583 | 3,830 | 3,876 | 52,897 | 38,794 | 41,524 | 37,998 | 40,751 | 41,031 |
| | $\Delta\delta$ | 0,010 | 0,013 | 0,003 | 0,013 | -0,010 | 0,007 | -0,008 | -0,002 | -0,030 | -0,002 | 0,007 | -0,003 |
| pH = 5,5 | δ (libre) | 5,078 | 3,658 | 3,974 | 3,592 | 3,859 | 3,887 | 53,165 | 38,986 | 42,015 | 38,242 | 40,900 | 41,248 |
| | δ (complejo) | 5,082 | 3,664 | 3,972 | 3,598 | 3,849 | 3,886 | 53,139 | 38,979 | 41,965 | 38,235 | 41,009 | 41,219 |
| | $\Delta\delta$ | 0,004 | 0,007 | -0,002 | 0,006 | -0,010 | -0,001 | -0,003 | -0,001 | -0,005 | -0,001 | 0,011 | -0,003 |
| pH = 7,4 | δ (libre) | 5,064 | 3,648 | 3,962 | 3,577 | 3,846 | 3,875 | 52,967 | 38,839 | 41,847 | 38,038 | 40,710 | 41,091 |
| | δ (complejo) | 5,069 | 3,656 | 3,960 | 3,584 | 3,831 | 3,876 | 52,910 | 38,800 | 41,762 | 38,002 | 40,760 | 41,035 |
| | $\Delta\delta$ | 0,005 | 0,008 | -0,002 | 0,007 | -0,016 | 0,001 | -0,006 | -0,004 | -0,008 | -0,004 | 0,005 | -0,006 |
| pH = 8 | δ (libre) | 5,066 | 3,650 | 3,964 | 3,578 | 3,848 | 3,877 | 52,957 | 38,824 | 41,837 | 38,026 | 40,699 | 41,080 |
| | δ (complejo) | 5,069 | 3,656 | 3,960 | 3,584 | 3,831 | 3,876 | 52,907 | 38,793 | 41,761 | 37,995 | 40,759 | 41,031 |
| | $\Delta\delta$ | 0,003 | 0,006 | -0,003 | 0,006 | -0,017 | -0,001 | -0,005 | -0,003 | -0,008 | -0,003 | 0,006 | -0,005 |
| pH = 8,7 | δ (libre) | 5,068 | 3,652 | 3,966 | 3,580 | 3,850 | 3,879 | 52,979 | 38,840 | 41,859 | 38,045 | 40,719 | 41,100 |
| | δ (complejo) | 5,072 | 3,658 | 3,964 | 3,586 | 3,834 | 3,879 | 52,911 | 38,787 | 41,774 | 37,993 | 40,772 | 41,035 |
| | $\Delta\delta$ | 0,004 | 0,006 | -0,002 | 0,006 | -0,017 | 0,000 | -0,007 | -0,005 | -0,008 | -0,005 | 0,005 | -0,007 |
| pH = 9,5 | δ (libre) | 5,070 | 3,653 | 3,969 | 3,582 | 3,853 | 3,881 | 52,973 | 38,824 | 41,859 | 38,037 | 40,717 | 41,093 |
| | δ (complejo) | 5,070 | 3,656 | 3,964 | 3,584 | 3,830 | 3,886 | 52,911 | 38,775 | 41,792 | 37,999 | 40,776 | 41,040 |
| | $\Delta\delta$ | -0,001 | 0,002 | -0,005 | 0,002 | -0,022 | 0,004 | -0,006 | -0,005 | -0,007 | -0,005 | 0,006 | -0,005 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|
| pH= 10 | δ (libre) | 5,064 | 3,648 | 3,964 | 3,577 | 3,848 | 3,876 | 52,780 | 38,629 | 41,699 | 37,849 | 40,534 | 40,900 |
| | δ (complejo) | 5,058 | 3,643 | 3,956 | 3,572 | 3,817 | 3,872 | 52,897 | 38,759 | 41,807 | 37,969 | 40,759 | 41,039 |
| | $\Delta\delta$ | -0,006 | -0,004 | -0,008 | -0,005 | -0,031 | -0,003 | 0,012 | 0,013 | 0,013 | 0,012 | 0,023 | 0,014 |
| pH = 12 | δ (libre) | 5,063 | 3,644 | 3,964 | 3,573 | 3,850 | 3,877 | 52,972 | 38,805 | 41,884 | 38,023 | 40,754 | 41,126 |
| | δ (complejo) | 5,065 | 3,651 | 3,963 | 3,579 | 3,824 | 3,879 | 52,958 | 38,822 | 41,867 | 38,033 | 40,820 | 41,101 |
| | $\Delta\delta$ | 0,002 | 0,007 | -0,001 | 0,006 | -0,025 | 0,002 | -0,001 | 0,002 | -0,002 | 0,001 | 0,007 | -0,003 |

Es bien conocido que la molécula de β CD adopta la conformación de cono, en la cual los protones H_3 y H_5 se localizan dentro de la cavidad, mientras que los H_2 y H_4 lo hacen por fuera. Los H_6 del grupo alcohol primario se encuentran en la parte angosta, mientras que los H_1 residen en el plano de los enlaces glicosídicos de la β CD (de Sousa y col.,2008). Generalmente, cuando un huésped aromático se incluye en la cavidad de la CD, las señales de los protones propios del receptor (H_3 y H_5) sufren $\Delta\delta$ significativos a campos altos, como consecuencia de los cambios en su entorno químico. Por lo tanto, los corrimientos de los protones H_3 y H_5 son altamente sensibles a la formación de complejos de inclusión.

Los $\Delta\delta$ de los huéspedes podrían ser diferentes, ya sean negativos o positivos, dependiendo de la posición de los protones en la cavidad.

Todos los protones de la HCT evidenciaron cambios en sus $\Delta\delta$ con el acomplejamiento de esta molécula con la CD (tabla 2.4), sugiriendo una inclusión total de la HCT dentro de la cavidad de la β CD. Sin embargo, la señal del protón H_3 de la HCT no se pudo determinar a todos los valores de pH debido a que la señal de este protón se solapaba con los picos remanentes del agua.

En la tabla 2.5 se pueden observar los $\Delta\delta$ de los protones H_3 y H_5 de la β CD en presencia de la HCT. De esta manera se confirma la formación del complejo de inclusión. Los corrimientos a campos altos de H_5 , localizado en la superficie interior del lado de los grupos hidroxilos primarios, fueron los más significativos a todos los valores de pH ensayados. Debido a los fuertes efectos de apantallamiento en los protones H_5 , en comparación con los de H_3 , se ha propuesto que la HCT penetra muy profundamente dentro de la cavidad de la CD. También se observaron los $\Delta\delta$ correspondientes a los protones localizados en la superficie de la β CD (H_1 , H_2 , H_4 y H_6), lo cual podría deberse a rearrreglos conformacionales en la molécula receptora.

Se puede observar que tanto para la HCT como para la β CD, a 45 °C (tablas 2.4 y 2.5), se produjeron pequeños $\Delta\delta$, lo cual sugiere una baja estabilidad del complejo de inclusión.

Para estudiar la dinámica del complejo, se realizaron estudios en dos dimensiones, llamados Espectroscopía de efecto Overhauser en sistemas giratorios (ROESY²). En estos experimentos se determinaron las distancias intermoleculares medias y las intensidades de los picos cruzados, entre las moléculas del receptor y el huésped. Los gráficos a y b de la figura 2.7, muestran el mapa de extensión de contorno para el sistema HCT/ β CD 1:1 en D₂O (~pH 5) a 25 y 45 °C. Los resultados a 25 °C (figura 2.7a), mostraron que el H₅ de la β CD comparte una señal de ROE³ con los protones H₁ (débiles) y H₂ (fuertes) de la HCT, mientras que el H₃ de la β CD tienen una señal ROE con el H₂ (fuerte) de la HCT. Con el objetivo de comprobar la estabilidad del complejo, se realizó el espectro de ROESY a 45 °C y éste demostró que los puntos de correlación desaparecen a esa temperatura (figura 2.7b), lo cual es consistente con la baja afinidad del complejo determinada por DSF e ITC, (tablas 2.2 y 2.3).

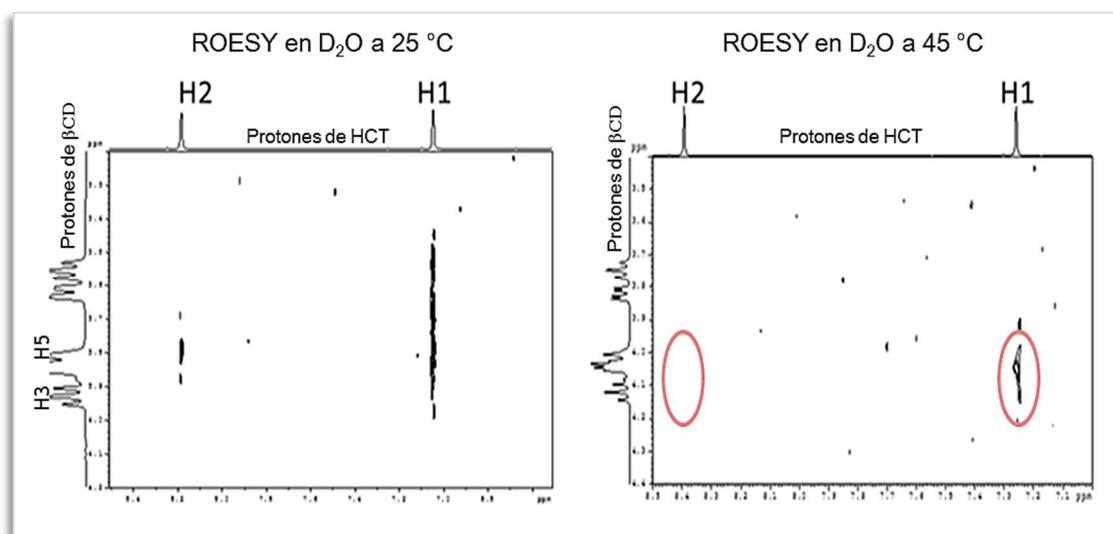


Figura 2.7: Gráfico de ROESY de la HCT y la β CD. a) 25°C. b) 45°C.

La evidencia experimental sugiere que la HCT ingresa completamente en la cavidad hidrofóbica de la β CD, como se muestra en la figura 2.8.

² Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy

³ Rotating Overhauser Effect

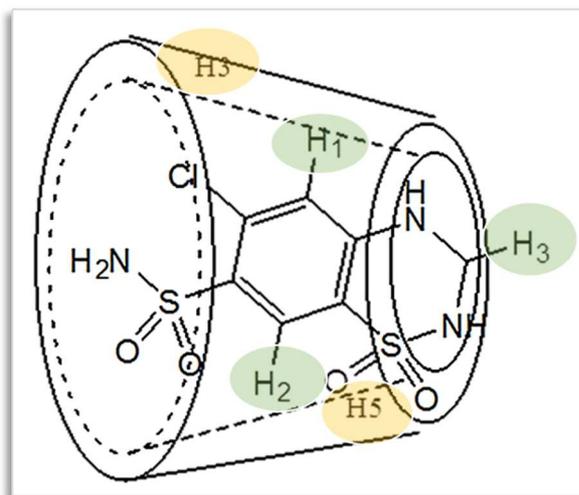


Figura 2.8: Complejo de inclusión propuesto. Verde, protones de la HCl.
Amarillo, protones internos de la β CD.

2.1.3.4 Análisis Estadístico de los Datos

Se utilizó el test t de Student, para determinar si las constantes de afinidad obtenida por ITC y DSF son comparables. Este test, considera que los datos son estadísticamente diferentes, cuando el valor de $p < 0,05$.

El análisis, indicó que las constantes calculadas por ambas técnicas, son estadísticamente semejantes, ya que en todos los casos, el valor del indicador p es mayor a 0,05. Los resultados se muestran en la tabla 2.6.

Tabla 2.6: Comparación de las constantes de afinidad obtenidas por DSF y por ITC. Análisis estadístico, utilizando el test-t de Student.

| Medio | T °K | DSP | ITC | p < 0,05 |
|----------|------|------------------------------|------------------------------|----------|
| | | $K_{1:1}$ (M ⁻¹) | $K_{1:1}$ (M ⁻¹) | |
| pH= 3 | 298 | 123 ± 5 | 110 ± 1 | 0,10 |
| | 310 | 114 ± 6 | 79 ± 1 | 0,07 |
| | 318 | 42 ± 8 | 70 ± 1 | 0,05 |
| pH = 5,5 | 298 | 126 ± 16 | 115 ± 1 | 0,16 |
| | 310 | 76 ± 12 | 76 ± 1 | 0,28 |
| | 318 | 76 ± 8 | 77 ± 2 | 0,60 |
| pH = 6,8 | 298 | 130 ± 15 | 128 ± 1 | 0,68 |
| | 310 | 71 ± 13 | 94 ± 3 | 0,24 |
| | 318 | 77 ± 7 | 94 ± 8 | 0,30 |
| pH = 7,4 | 298 | 111 ± 12 | 120 ± 1 | 0,80 |
| | 310 | 86 ± 17 | 107 ± 3 | 0,20 |
| | 318 | 75 ± 11 | 89 ± 2 | 0,10 |
| pH = 8 | 298 | 82 ± 7 | 111 ± 3 | 0,06 |
| | 310 | 69 ± 9 | 68 ± 2 | 0,10 |
| | 318 | 80 ± 8 | 81 ± 4 | 0,60 |
| pH = 10 | 298 | 25 ± 5 | 38 ± 1 | 0,05 |
| | 310 | 19 ± 2 | 26 ± 1 | 0,20 |
| | 318 | 36 ± 5 | 43 ± 7 | 0,20 |

2.1.4 Discusión Final de Resultados y Conclusiones Parciales

Se obtuvo un complejo supramolecular entre la HCT y la β CD. El mismo fue ampliamente caracterizado en estado líquido, utilizando técnicas de DSF, ITC y NMR.

Por ITC, se utilizó el modelo de “un sitio de unión”, estableciéndose la formación del complejo de inclusión y la estequiometría 1:1, lo cual correlaciona con los resultados obtenidos con los estudios de DSF. El complejo presentó un comportamiento exotérmico.

Las constantes de estabilidad obtenidas, por ambas técnicas, fueron estadísticamente similares.

Se estudió la influencia que tienen la temperatura y el pH en las constantes de estabilidad del complejo y se encontró que a medida que aumenta el estado de ionización de la HCT, disminuye su afinidad por la β CD, lo cual es consistente con el elevado costo energético de la desolvatación de las especies hidratadas de la HCT ionizada.

Con respecto al efecto de la temperatura, las más bajas constantes de estabilidad se cuantificaron a medida que aumenta la temperatura en el rango de 25 a 45 °C. Este fenómeno fue atribuido a las modificaciones en la red de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de ligando y de receptor.

Con el presente estudio se comprobó la formación de un complejo de inclusión entre la HCT y la β CD. Los diferentes métodos utilizados evidenciaron la baja estabilidad del complejo. La dependencia con el estado de ionización y de la temperatura, en la afinidad del huésped por el receptor, es crucial a la hora de hacer un diseño racional de nuevos materiales basados en la química de la autoagregación.

PARTE II: CARACTERIZACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

2.2.1 Instrumental

Las muestras liofilizadas se obtuvieron utilizando un liofilizador Freeze Dry 4.5 Labconco Corporation.

Los análisis térmicos se llevaron a cabo utilizando los equipos de calorimetría diferencial de barrido, TA DSC 2920 y de análisis termogravimétrico, TA TG 2920.

Los espectros infrarrojos se obtuvieron utilizando un espectrómetro Espectrofotómetro 5 SXC Nicolet FT-IR

Los ensayos de disolución se realizaron en un disolutor Hanson SR11 6 Flak Dissolution Test Station, Hanson Research Corporation, Chatsworth, USA.

2.2.2 Preparación de muestras

2.2.2.1 Mezcla física

La mezcla física (MF) se obtuvo colocando en un mortero la HCT y la β CD en las cantidades correspondientes a la estequiometría determinada experimentalmente, es decir en una relación 1:1. Los componentes se trituraron en seco hasta obtener un polvo homogéneo.

2.2.2.2 Liofilizado

Para obtener el complejo de inclusión liofilizado, se prepararon soluciones acuosas de HCT (2 mM) y β CD (12 mM), cada una por separado y en su máxima solubilidad. Se pusieron en contacto cantidades correspondientes a la estequiometría 1:1 y se colocaron en un sonicador, por al menos 2 h para favorecer la formación del complejo. Luego estas soluciones se filtraron, se congelaron y se colocaron en el liofilizador por 72 h.

2.2.3 Métodos

2.2.3.1 Análisis térmico: Calorimetría Diferencial de Barrido y Análisis Termogravimétrico

Los estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) se realizaron con 0,8 – 1 mg de muestra, en pans herméticos. La rampa de calentamiento fue de 10 °C/min, comenzando a temperatura ambiente hasta un máximo de 350 °C.

Los Análisis Termogravimétricos (TGA) se realizaron en pans no herméticos, con 1 – 1,2 mg de muestra. Este estudio se llevó a cabo con atmósfera controlada de nitrógeno (N₂) y con una rampa de calentamiento de 10°C/min hasta un máximo de 350°C.

Por ambas técnicas fueron analizadas muestras de HCT comercial, βCD comercial, la mezcla física de HCT/βCD y el sistema HCT/βCD liofilizado.

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software del equipo TA Instrument Universal Análisis 2000.

2.2.3.2 Espectroscopía Infrarroja

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) se realizó para cada componente puro de HCT y βCD, para la mezcla física y para el sistema liofilizado, utilizando el método de discos de KBr y escaneando en el rango de 4000-450 cm⁻¹.

La concentración de cada componente fue del 1% en los discos de KBr, de esta manera, se obtuvieron espectros más claros y definidos. El KBr se secó previamente en una estufa a 40 °C por 24 h, para asegurar que los picos correspondientes al agua no interferirán con aquellos pertenecientes a los compuestos en estudio.

2.2.3.3 Ensayos de Disolución

Los estudios de disolución se realizaron en un equipo de disolución, utilizando el aparato N°2, método de las paletas. Los ensayos se llevaron a cabo a una temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C. Los vasos se llenaron con 300 mL de una solución de HCl 0,1 M como medio de disolución, el cual fue previamente desgasificado, filtrado y precalentado. Se trabajó con una velocidad de agitación de 100 rpm.

Particularmente en estos ensayos, se utilizó el polvo de la HCT comercial, la HCT liofilizada, la mezcla física entre la HCT y la β CD y, el complejo de inclusión entre la HCT y la β CD liofilizado, ya que no fue posible realizar los comprimidos con estos sistemas, debido a la pequeña cantidad de muestra utilizada a causa de la baja solubilidad del principio activo. Las muestras utilizadas para el ensayo contenían cantidades equivalentes a 50 mg de HCT. El polvo se introdujo rápidamente en el vaso, de modo que se deposite en el fondo. Se tomaron 15 muestras durante 90 min de 5 mL cada una, con reposición de medio precalentado. Las muestras fueron diluidas y cuantificadas utilizando espectroscopía UV-Vis a 273 nm. Los resultados están expresados como porcentaje de fármaco liberado (\pm DS) a cada tiempo muestreado.

Los datos de liberación de HCT se analizaron utilizando el factor de similitud (f_2), el cual relaciona dos curvas de disolución por medio de la siguiente ecuación:

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad \text{Ecuación 2.13}$$

en donde n es el número de muestras tomadas, R_t y T_t son los porcentajes disueltos de la referencia y del producto, respectivamente, a cada tiempo t . Para que las curvas sean consideradas similares el valor de f_2 debe ser mayor a 50 (50 – 100), lo cual implica una diferencia entre cada punto muestreado menor al 10%. Esto asegura la equivalencia entre las curvas y el comportamiento de ambos productos, el evaluado y el de referencia (Xie y col., 2015).

2.2.4 Resultados y Discusión

2.2.4.1 Análisis Térmico: DSC y TGA

El análisis térmico comprende una serie de técnicas que permiten determinar cambios en propiedades físicas y/o químicas de una sustancia o sistema en función de la temperatura, mientras se somete a la muestra a un régimen de temperaturas programado y controlado.

En el estudio del efecto de la temperatura sobre sólidos es ventajoso el empleo de técnicas combinadas. Las técnicas más utilizadas, en el área farmacéutica, son la DSC y el TGA. La combinación del análisis de DSC con la determinación de TGA, es muy útil en la asignación de los eventos térmicos observados.

TGA y DSC representan los instrumentos analíticos de primera opción para la caracterización físico-química precisa en estado sólido de los componentes en estudio. Los análisis térmicos son comúnmente utilizados como método de rutina para una rápida investigación preliminar cualitativa. Este método se basa en comparar el comportamiento térmico de los componentes puros, sus mezclas físicas y el complejo de inclusión preparado por un procedimiento estandarizado. El propósito consiste en encontrar diferencias evidentes entre la mezcla física y el complejo de inclusión formado (Giordano y col., 2001).

Se estudió el comportamiento térmico del complejo de inclusión HCT/ β CD, su mezcla física y los componentes puros, utilizando las técnicas de DSC y TGA para confirmar la formación del complejo sólido. Los termogramas se presentan en los gráficos de las figuras 2.9 y 2.10. En la tabla 2.7 se indican los eventos más significativos que se desarrollaron a lo largo del estudio.

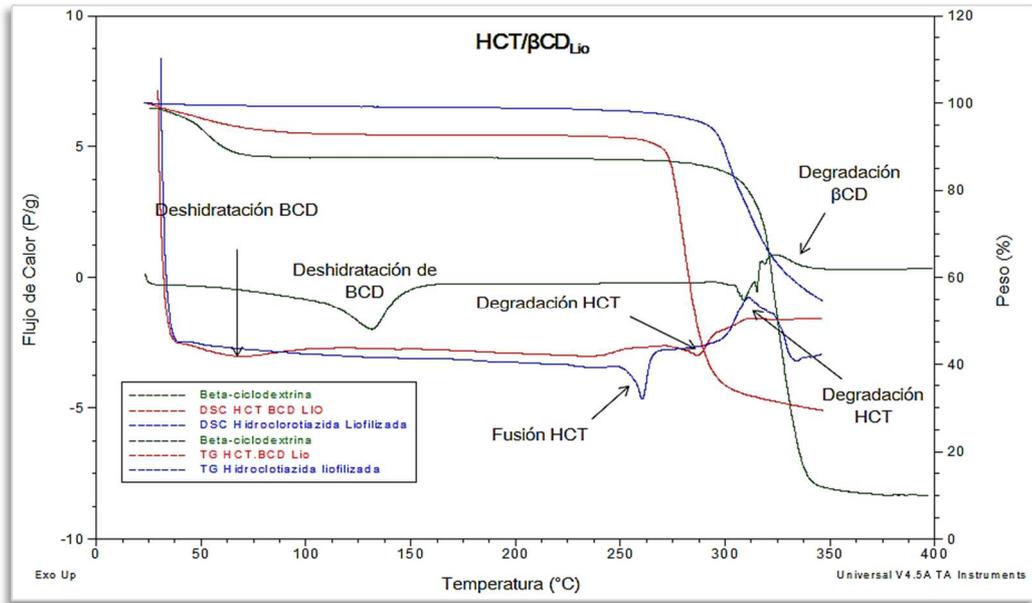


Figura 2.9: Curvas de DSC/TGA, de los componentes puros y del complejo entre la HCT y la βCD liofilizado.

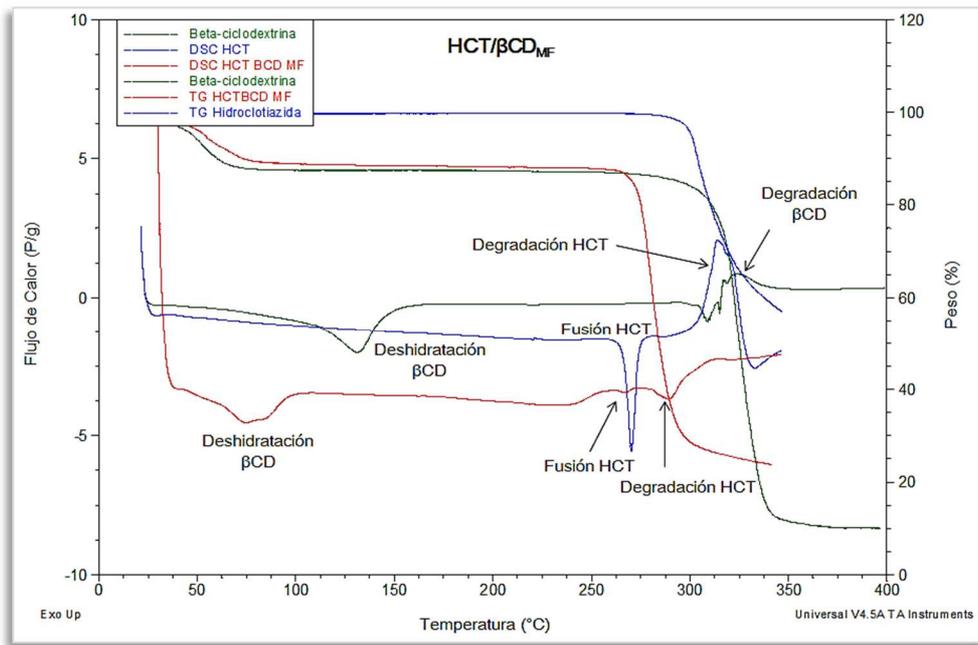


Figura 2.10: Curvas de DSC/TGA, de los componentes puros y de la mezcla física entre la HCT y la βCD.

Tabla 2.7: Eventos significativos observados en los estudios de DSC/TGA.

| Sustancia | Evento | Pico (°C) |
|---|--------------------|-----------|
| βCD | Fusión | 309 |
| | Degradación | 324,3 |
| | Deshidratación | 131,4 |
| HCT comercial | Fusión | 270,3 |
| | Degradación | 313,7 |
| Mezcla física entre HCT/ βCD | Deshidratación βCD | 74,9 |
| | Fusión HCT | 267,2 |
| | Degradación HCT | 289,7 |
| Complejo de inclusión HCT/ βCD liofilizado | Deshidratación βCD | 70,4 |
| | Fusión HCT | No hay |
| | Degradación HCT | 287 |

El perfil termoanalítico de la βCD se divide en tres zonas: 1) Pérdida de agua, desde temperatura ambiente hasta 120 °C; 2) Degradación térmica, acompañada por oxidación en el aire, que comienza alrededor de 250 °C, al principio en fase sólida y después de la fusión que ocurre aproximadamente a 300 °C, continúa en estado líquido; 3) Comienzo de la ignición de la muestra, después de 300 °C. Entre 120 - 280 °C la curva de TG es plana y no se detecta pérdida de peso, mientras que en el DSC, a 210 – 240 °C, se observan pequeños eventos (Giordano y col., 2001).

La HCT exhibe un pico endotérmico a los 270 °C, correspondiente a la fusión del IFA y otro a 314 °C, debido a su degradación.

En la MF entre la HCT y la βCD, se observó la presencia de picos correspondientes a la deshidratación de la βCD a 75 °C y la fusión, con posterior degradación de la HCT, a 267 y 290 °C, respectivamente. Debido a que se mantienen todos los picos característicos de ambos componentes, se corrobora que no existe interacción entre los compuestos, por lo tanto no se forma el complejo de inclusión.

Los termogramas de la muestra del complejo de inclusión entre la HCT y la β CD liofilizada fueron diferentes a los obtenidos con los componentes puros, lo cual es una clara evidencia de la formación del complejo de inclusión, ya que desaparecieron los picos endotérmicos característicos del fármaco puro. Las curvas de DSC y TGA del complejo, son diferentes a aquellas obtenidas con las sustancias de partida, lo cual evidencia la formación de una nueva especie. Los eventos observados son atribuidos a la deshidratación de la β CD a 70 °C, ya que la CD tiene incorporada moléculas de agua en su estructura; así como la descomposición de la HCT a los 289 °C, con la desaparición del pico atribuido a la fusión. Si bien la descomposición de la HCT ocurre 30 °C antes que cuando el IFA estaba libre, no es un dato muy relevante, ya que este evento ocurre a una temperatura superior a los 250 °C, por lo tanto no se considera que el IFA pierda estabilidad.

2.2.4.2 Espectroscopia Infrarroja

La espectroscopia infrarroja (IR), es una técnica muy útil para la caracterización de IFAs en estado sólido, especialmente cuando la medición se realiza mediante el método de la transformada de Fourier (FT-IR). La energía infrarroja, es una pequeña porción dentro del espectro electromagnético y se divide en 3 regiones, IR-lejano (50 – 400 cm^{-1}), IR-medio (400 – 4000 cm^{-1}) e IR-cercano (4000 – 14000 cm^{-1}). En análisis cualitativo de moléculas de interés farmacéutico, el rango de frecuencias más utilizado es de 600 a 4000 cm^{-1} .

Esta técnica se utiliza para obtener información estructural, ya que se basa en los modos de vibración de una molécula. Cuando la fuente de energía IR irradia una muestra, la absorción de energía por la muestra es el resultado de transiciones entre los niveles moleculares de energía vibracional y rotacional, siendo dichas transiciones muy sensibles a los detalles de la estructura molecular. Esto produce espectros estructurados singularmente útiles para la identificación de fármacos y otras sustancias orgánicas.

La evidencia aportada por los estudios de FT-IR, corroboran la formación de un complejo de inclusión entre la HCT y la β CD. El espectro de absorción característico de HCT presentó bandas de absorción características a 1605,

1554, 1523 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos aminos (N-H) de la molécula. También se observaron bandas de absorción a 1335 y 1319 cm^{-1} correspondiente a los grupos S-O₂ de ambos anillos de la HCT. Por su parte, el espectro de absorción de la β CD presentó bandas de absorción a 3370 cm^{-1} atribuidas al estiramiento del grupo O-H, a 2900 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo alifático C-H y por último a 1028 cm^{-1} debido al estiramiento del O-H primario del carbohidrato. Las bandas características de las CDs son poco influenciadas por la formación de complejos. Por esta razón, es que se centra la atención en el análisis de los estiramientos de los grupos funcionales del IFA.

El espectro de absorción correspondiente a la MF entre la HCT y la β CD, no presentó modificaciones de las frecuencias en que aparecen las bandas de absorción características de cada uno de sus componentes, lo que indica que los componentes no están interactuando. Simplemente, el espectro de la MF correspondió a la superposición de los espectros de los componentes puros. Por otro lado, en el complejo liofilizado, se observaron cambios, no solo en las frecuencias, sino también en la forma de los picos y en sus intensidades, como se puede observar en la figura 2.11. Los grupos N-H de la HCT presentaron pequeños corrimientos en su espectro de absorción (1600, 1563, 1518 cm^{-1}), mientras que uno de los grupos S-O₂ de la HCT fue especialmente afectado, ya que desapareció por completo. Los cambios en las frecuencias de absorción para ambos sistemas se presentan en la tabla 2.8.

Tabla 2.8: Señales de estiramiento de los grupos funcionales de la HCT pura, HCT en la mezcla física y de HCT en el sistema liofilizado.

| Grupo funcional | HCT (ν , cm^{-1}) | Sistema MF (ν , cm^{-1}) | Sistema Lio (ν , cm^{-1}) |
|------------------|----------------------------------|---|--|
| N-H | 1605 | 1606 | 1600 |
| | 1554 | 1554 | 1563 |
| | 1523 | 1523 | 1518 |
| S-O ₂ | 1335 | 1336 | 1333 |
| | 1319 | 1320 | Desaparece |

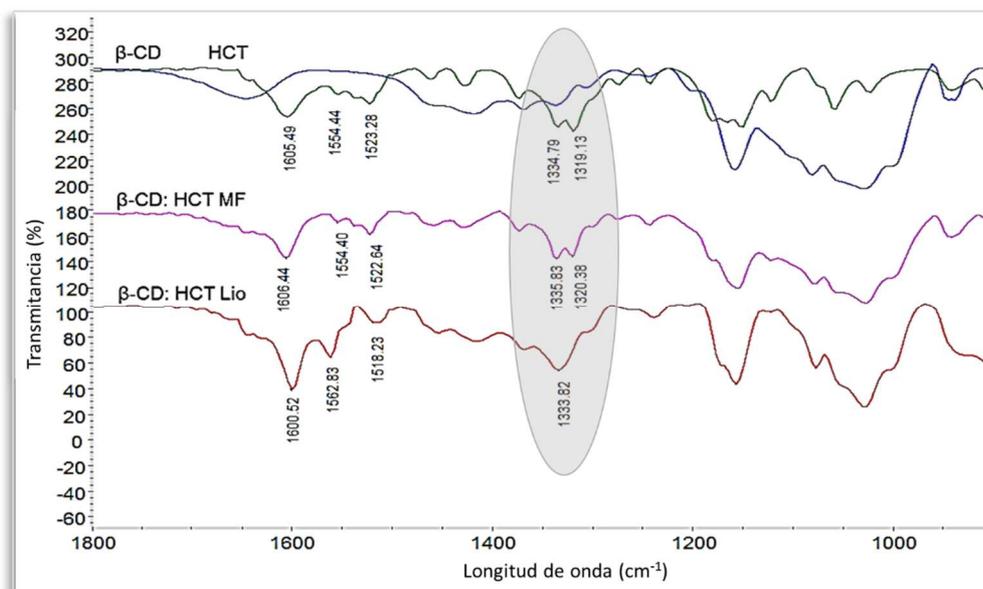


Figura 2.11: Espectros FT-IR obtenidos para la HCT, la β CD, la mezcla física (HCT: β CD MF) y el complejo de inclusión liofilizado (HCT: β CD Lio).

2.2.4.3 Ensayos de Disolución

Los fármacos con baja solubilidad en agua tienen propiedades biofarmacéuticas desfavorables, tal como limitado rango de disolución, absorción lenta y baja biodisponibilidad. Estos fármacos tienden a ser eliminados desde el TGI antes de que hayan sido totalmente disueltos y de alcanzar la circulación sanguínea. En este contexto, la dosificación de IFA poco solubles en agua tiende a ser mayor para alcanzar una adecuada concentración terapéutica en sangre, resultando potencialmente en toxicidad local. Así, el aumento en el rango de disolución en fluidos biológicos, es el objetivo principal en la liberación de fármacos poco solubles (Mora y col., 2013).

Los estudios de disolución se realizaron en un equipo específico para este fin, utilizando el aparato N°2, método de las paletas, como se especifica en la USP 32 (figura 2.12). Dicho aparato consta de 6 vasos. Cada uno de esos vasos es transparente, provisto de una tapa, construido en vidrio u otro material inerte, consta de un eje metálico y una paleta. El vaso debe estar sumergido en un baño de agua que permite mantener una temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C dentro del vaso durante el ensayo. Ninguna parte del aparato, ni el área donde está instalado, debe producir movimiento significativo, agitación o vibración más allá de la

debida al elemento de agitación. El vaso es cilíndrico con fondo semiesférico, con una capacidad nominal de 1 litro. El vaso puede tener una tapa para retardar la evaporación. La paleta se coloca de tal modo que su eje vertical no se separe más de 2 mm, en cualquier punto del eje vertical del vaso y rote sin desviarse significativamente. La distancia entre el borde inferior de la paleta y el fondo del vaso se debe mantener a 25 ± 2 mm durante el ensayo (FDA, 2001).

El medio de disolución preferentemente utilizado es agua desgasificada. Pueden emplearse, según las características de solubilidad del principio activo, soluciones tamponadas de pH 4 a 8 o HCl 0,001 a 0,1 M. El volumen empleado usualmente, es 900 mL, pudiendo variar entre 300 y 900 mL. Los gases disueltos pueden producir burbujas que pueden modificar los resultados del ensayo. Para desgasificar las muestra se debe calentar el medio, agitar suavemente y filtrar inmediatamente aplicando vacío, empleando un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ o de porosidad menor, agitando vigorosamente y continuar con la agitación aplicando vacío, durante aproximadamente 5 min.

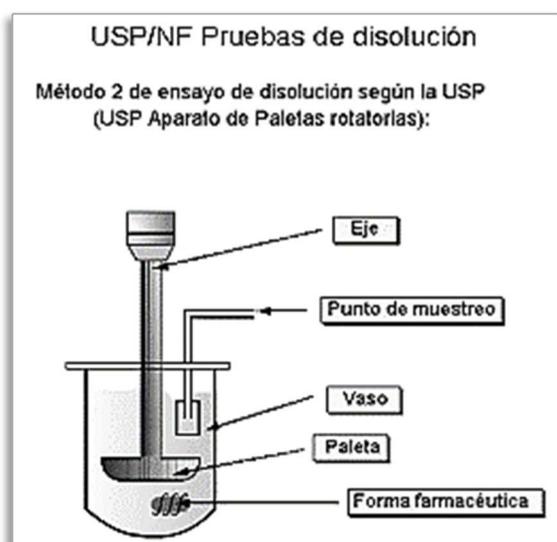


Figura 2.12: Esquema del método de las paletas.

Se observó una gran diferencia en los perfiles de disolución del polvo de HCT comercial (HCT) y de la HCT liofilizada (HCT_{Lio}). La HCT_{Lio} se disolvió más del 60% en menos de 10 min, es decir, mucho más rápido comparado con el polvo de la HCT comercial, menos del 40% en 10 min. Esto, puede deberse a un

aumento del área superficial del fármaco como resultado de la reducción del tamaño de la partícula y por cambios en la estructura cristalina del IFA.

Comparando los perfiles de disolución del complejo liofilizado y de la MF entre la HCT y la β CD, se pudo observar que la HCT, presente en el complejo de inclusión, mostró mayor velocidad de disolución, lo cual podría deberse a un aumento en su solubilidad debido a la inclusión del IFA en la cavidad de la β CD; prácticamente todo el complejo se disolvió en los primeros minutos del ensayo, llegando a más del 90% del fármaco disuelto en menos de 10 minutos.

Los valores de f_2 calculados se presentan en la tabla 2.9. Éstos corroboran las interpretaciones gráficas, asegurando que los perfiles de liberación son diferentes entre sí. Los perfiles de disolución de los sistemas evaluados se muestran en el gráfico de la figura 2.13.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede concluir que el complejo de inclusión formado entre HCT y β CD, mejora la velocidad de disolución del IFA.

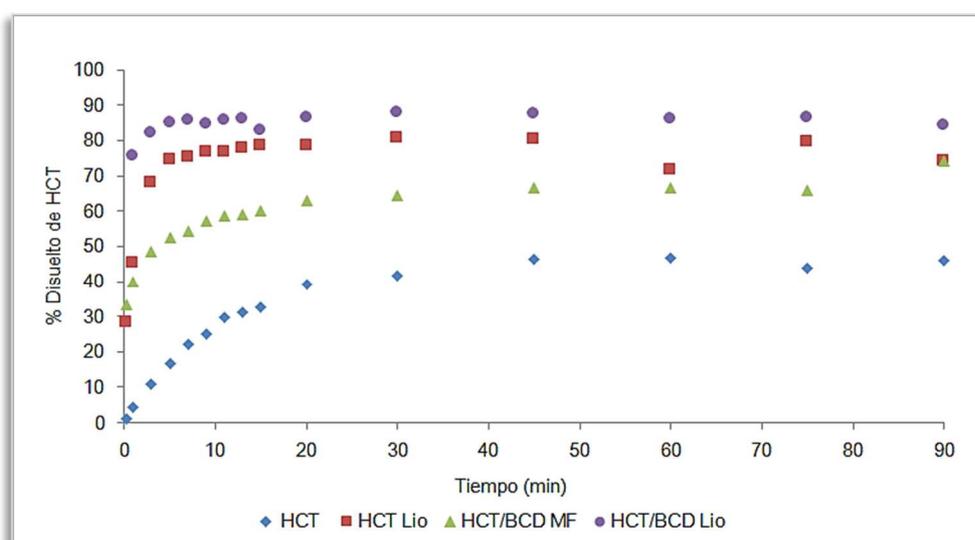


Figura 2.13: Perfiles de disolución, % Fco disuelto vs Tiempo (min). HCT comercial, HCT liofilizada, HCT:βCD mezcla física, HCT:βCD complejo de inclusión liofilizado.

Tabla 2.9: Valores de f_2 calculados para comparar los distintos sistemas.

| SISTEMA | f_2 |
|--|-------|
| HCT: HCT/ β CD MF | 27 |
| HCT:HCT Lio | 18 |
| HCT:HCT/ β CD Lio | 13 |
| HCT/ β CD MF:HCT/ β CD Lio | 29 |
| HCT Lio:HCT/ β CD Lio | 45 |

2.2.5 Discusión Final de Resultados y Conclusiones Parciales

Los resultados obtenidos con los estudios de estado sólido, utilizando las técnicas de FT-IR, DSC/TGA y ensayos de disolución, permitieron comprobar la formación de un complejo de inclusión entre la HCT y la β CD.

Si bien la FT-IR, no es una técnica muy sensible para la caracterización de complejos de inclusión de CD, se observó en los espectros del complejo liofilizado, que los picos correspondientes a los grupos funcionales de la HCT, sufren modificaciones cuando se encuentran formando parte de dicho complejo. Mientras que, en el espectro de la MF, se evidenciaba la presencia de las señales de los componentes individuales sin interaccionar, ya que los espectros presentaban los mismos picos que los de las muestras puras.

Por medio del análisis térmico, se comprobó que el comportamiento del complejo de inclusión fue totalmente diferente, en comparación con el observado para los componentes puros y la correspondiente MF.

Los ensayos de disolución evidenciaron un notable aumento en la velocidad de disolución del IFA en estudio, ya que a los 10 min se disolvió más del 90 % de la HCT. Lo cual indica una mejora en una de las características biofarmacéuticas desfavorables de este IFA.

La evidencia experimental apoya la hipótesis de que la HCT ingresa en la cavidad de la β CD, formando un complejo de inclusión.

PARTE III: MÉTODOS COMPUTACIONALES

2.3.1 Metodología Aplicada de Modelado Molecular

Los estudios computacionales se realizaron en colaboración con el Dr. Mario Alfredo Quevedo, investigador de UNITEFA-CONICET, en el departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

La estructura inicial de la HCT fue construida utilizando el *software* Gabedit (Allouche, 2011), luego se llevaron a cabo los análisis conformacionales y energéticos con el *software* Gaussian03 (Fisch, y col., 2004). La conformación de mínima energía se obtuvo aplicando una búsqueda conformacional sistemática basada en métodos semiempíricos (AM1), por último se optimizó la conformación de mínima energía utilizando métodos *ab initio* a nivel de teoría HF/6-31G*. Se calcularon las cargas sobre la geometría final optimizada, utilizando el modelo de cargas del potencial electrostático restringido (RESP), el cual también fue utilizado para modelar las interacciones electrostáticas entre HCT y β CD.

Los complejos formados entre la HCT y la β CD bajo diferentes condiciones simuladas, fueron predichos por *docking* molecular utilizando paquetes de *software* desarrollados por OpenEye Scientific Software (OpenEye Scientific Software).

Las estructuras iniciales del ligando fueron obtenidas, como se mencionó previamente, mientras que la estructura de la β CD se obtuvo de la base de datos estructural de Cambridge (código BCDEXD10). Los procedimientos de *docking* molecular consistieron de tres fases:

- a) Generación y parametrización de una librería de conformeros del ligando, la cual fue realizada utilizando el *software* OMEGA (Hawkings, y col., 2010)(Omega, 2.3.4 OpenEye Scientific Software), asumiendo una energía umbral de 10 kcal/mol.
- b) Las simulaciones de *docking*, se realizaron aplicando una estrategia de *docking* exhaustivo rígido, tal como se encuentra implementado en el paquete de programas FRED3 y OEDocking; (M. J. . McGann, 2011) (M. J.

McGann, 2012) (OpenEye Scientific Software) para evaluar las correspondientes energías de interacciones intermoleculares se utilizó el campo de fuerza de ChemGauss3 estudiándose las 10 mejores poses de *docking*.

- c) La visualización y el análisis de los modos de unión se llevó a cabo utilizando el software VIDA v.4.2.1 (OpenEye Scientific Software) (VIDA, 4.1.2. OpenEye Scientific Software), seleccionando las poses de *docking* correspondientes a ser utilizadas/estudiadas posteriormente mediante simulaciones de dinámica molecular (DM).

El software Amber12 fue utilizado para los estudios de DM (Case y col., 2005). Las cargas atómicas y parámetros moleculares correspondientes a HCT fueron asignados desde los campos de fuerza GAFF (Wang y col., 2004), mientras que los correspondientes a β CD provenían de los campos de fuerza GLYCAM_06 (Kirschner y col., 2008). Para realizar esas simulaciones, el complejo obtenido por *docking* molecular fue utilizado como estructura inicial, incluyéndose un modelo de solvente explícito, para lo cual se adicionó una caja de moléculas de agua, pre equilibradas correspondientes al modelo TIP3P. Previo a la ejecución de los estudios de dinámica molecular, el sistema solvatado fue sometido a etapas de minimización energética a modo de optimizar la estructura inicial del solvente solvatado. Los sistemas minimizados resultantes fueron luego calentados a las temperaturas indicadas (25, 37 y 45°C), por 20 ps, utilizando un *time step* de 2 fs bajo condiciones de presión constante y temperatura. El algoritmo SHAKE fue utilizado para aplicar una restricción energética sobre los átomos de hidrógeno. Después de que el sistema fue calentado, se realizó una etapa de equilibrio del sistema termostatizado (1 ns) seguida por la correspondiente etapa de producción (10 ns).

Los análisis de la trayectoria de DM fueron realizados utilizando el módulo *cpptraj* de Amber12. Incluyendo el análisis de descomposición energética para evaluar de manera cuantitativa la interacción intermolecular entre la HCT y la β CD, los cuales se realizaron según la metodología MM-PBSA (molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area) (Kuhn y col., 2005). Para la visualización de las trayectorias de DM se utilizó el *software* VMD v.1.9 (Humphrey y col., 1996). Los estudios de DM presentados fueron realizados

utilizando un *software* específico implementando el código CUDA (pmemd.cuda) y ejecutados en supercomputadoras facilitadas por el grupo de computos GPGPU de la Facultad de Matemática, Astronomía y Física (FAMAF), Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

2.3.2 Resultados de los Estudios de Modelado Molecular

2.3.2.1 Estudios de *Docking* Molecular

Los ensayos de *docking* del ligando (HCT) a la β CD, fueron realizados considerando los tres posibles estados de ionización de HCT, obteniendo en todos los casos dos modos de unión alternativos en las cuales el anillo A o el anillo B (figura 2.14) del fármaco, están profundamente incorporados dentro de la cavidad hidrofóbica de la β CD.

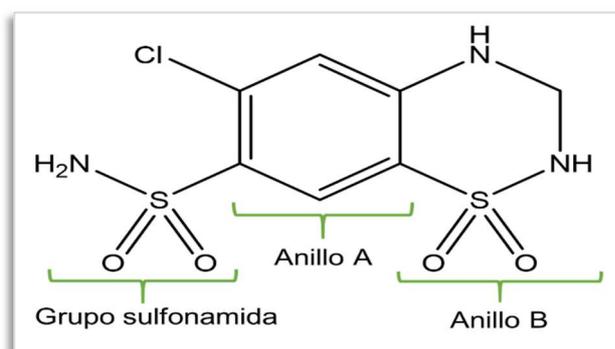


Figura 2.14: Señalización de los anillos A, B y grupo sulfonamida de la Hidroclorotiazida.

En la figura 2.15 se muestran las dos poses alternativas obtenidas para la especie neutra de HCT. En la pose-1 de unión (figura 2.15a), el anillo de benzotiadiazina (anillo B) de la HCT se encuentra profundamente inserto dentro de la cavidad de la β CD, mientras que en la pose-2 de unión (figura 2.15b) la mitad del clorobenzil (anillo A) está introducido dentro de la cavidad hidrofóbica y orientado hacia el borde más angosto de la β CD.

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de *scoring* asignados por ChemGauss3 para ambas poses (-27,5 y -32,6, para la pose-1 y

la pose-2, respectivamente) y, por lo tanto, mediante estudios de *docking*, no fue posible poder discriminar cuál de estos dos modos de inclusión era el más estable. Los desplazamientos en los corrimientos químicos cuantificados por ^1H NMR en los protones localizados en la superficie exterior de βCD (H_2 y H_4) evidenciaron que, después del acomplejamiento ocurriría un cambio conformacional en la molécula huésped (tabla 2.5). Esta observación sugirió fuertemente que tienen lugar marcados fenómenos de ajuste cuando la HCT se encuentra introducida en la estructura de βCD . Considerando que el proceso de *docking* molecular se realizó sobre la estructura de la βCD nativa (BCDEXD10, i.e, sin ligando), no había expectativas de que, aplicando un enfoque de *docking* rígido, se pudiera predecir la conformación inicial del complejo, aunque el mismo constituye un punto de partida útil para estudios posteriores de refinamiento estructural. Para llevar a cabo dichos refinamientos se realizaron estudios adicionales de dinámica molecular de los complejos correspondientes.

Con respecto a las formas mono- y di-ionizada de HCT (figura 2.16 y 2.17, respectivamente), se ha descrito un comportamiento similar al observado para HCT neutra, y se han encontrado dos modos de unión alternativos, los cuales también exhibieron valores de *scoring* similares, determinados por ChemGauss3.

De esta manera los estudios de *docking* molecular confirmaron que la HCT está ubicada dentro de la cavidad de la βCD . Se ha reportado, que esta técnica no es suficientemente precisa para evaluar definitivamente la conformación del complejo de inclusión (Zoppi y col., 2010; Zoppi y col., 2008) y consecuentemente, no sería seguro correlacionar las poses de unión observadas con los resultados experimentales. De todos modos, los métodos de *docking* fueron útiles para predecir la pose inicial del complejo, la cual luego fue sometida a refinamientos adicionales por métodos de DM, en donde se tuvo en cuenta la flexibilidad del receptor (βCD), el efecto de la temperatura y también del solvente.

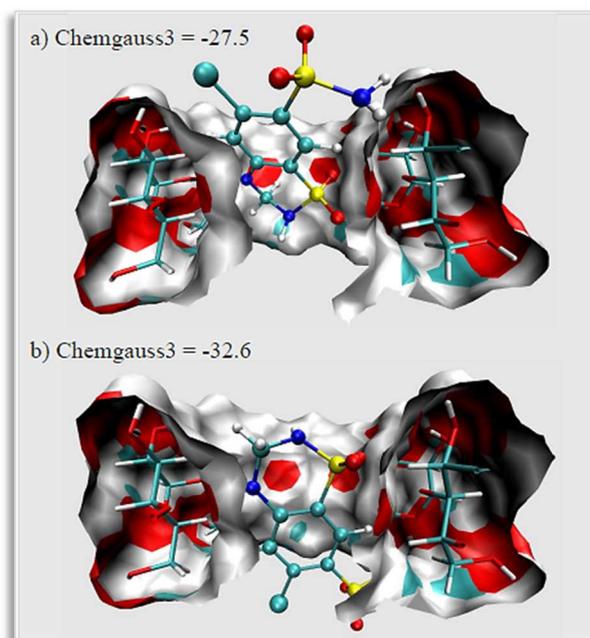


Figura 2.15: Representación tridimensional de los modos de unión entre HCT neutra y β CD, predicha por docking molecular. a) pose-1. b) pose-2. Se muestran los valores de scoring determinados por Chemgauss3.

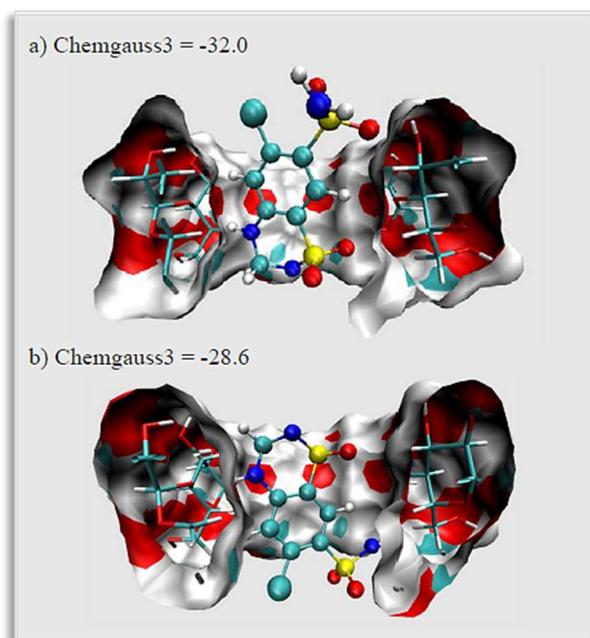


Figura 2.16: Representación tridimensional de los modos de unión entre HCT mono-ionizada y β CD, predicha por docking molecular. a) pose-1. b) pose-2. Se muestran los valores de scoring determinados por Chemgauss3.

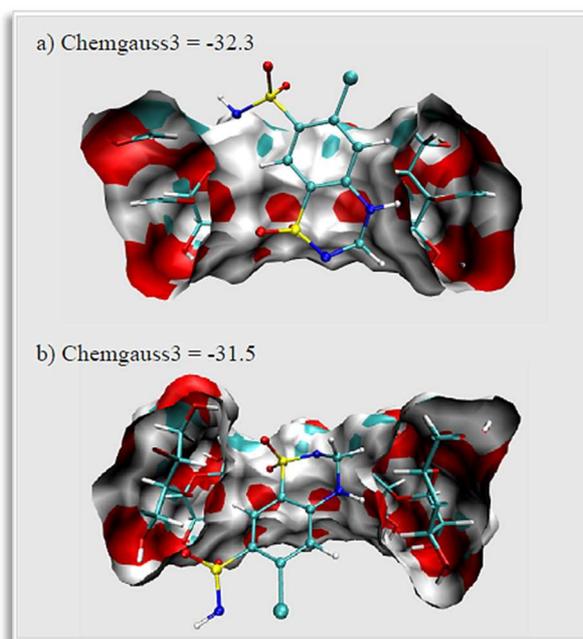


Figura 2.17: Representación tridimensional de los modos de unión entre HCT di-ionizada y β CD, predicha por docking molecular. a) pose-1. b) pose-2. Se muestran los valores de scoring determinados por Chemgauss3.

2.3.2.2 Estudios de Dinámica Molecular

Los complejos mostrados en las figuras 2.15 - 2.17, se sometieron a simulaciones de DM bajo las condiciones descritas anteriormente. Para analizar el comportamiento estructural del complejo, se analizaron las correspondientes trayectorias de producción, las cuales fueron alineadas y utilizadas para analizar los perfiles de desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) en función del tiempo, utilizando como estructura de referencia al complejo inicial obtenido por *docking* molecular. En todos los casos, se observó un significativo rearrreglo conformacional de la molécula receptora (RMSD entre 2 y 4 Å), lo cual es consistente con el $\Delta\delta$ calculado para H₁, H₂, H₆ y H₄ de los experimentos de ¹H NMR (tabla 2.5).

La figura 2.18 muestra los perfiles de RMSD en función del tiempo, para ambas poses del *docking*, considerando todas las especies de HCT estudiadas. Para la HCT neutra se puede ver que tienen lugar rearrreglos estructurales durante las etapas iniciales de trayectoria de producción, (0 – 5000 pasos de

dinámica), alcanzado el equilibrio en la estructura entre los 6 y 10 ns de simulación (35000 – 55000 pasos).

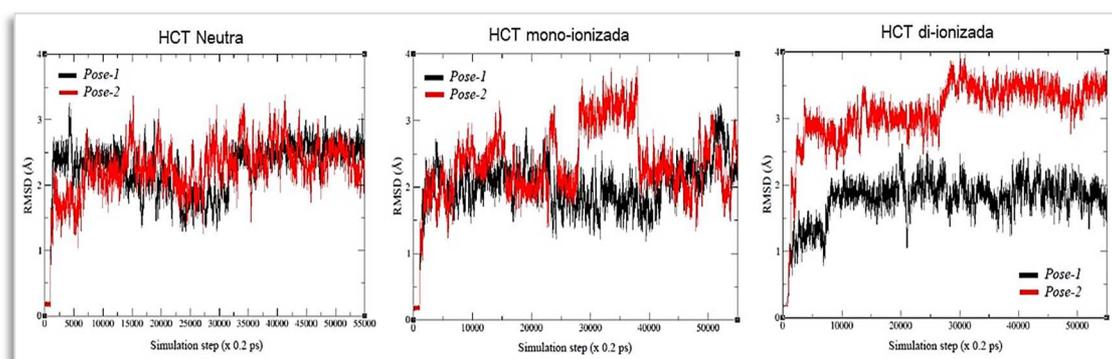


Figura 2.18: Perfiles RMSD (Å) vs tiempo (ps), para ambas poses del docking de todas las especies de HCT estudiadas.

Para identificar la pose de unión más estable entre las dos poses de unión analizadas, se realizaron análisis de descomposición energética en el intervalo 6-10 ns, presentándose los resultados obtenidos en la tabla 2.10. Se puede observar que para la HCT neutra, el modo de inclusión más estable fue la pose-1, la cual exhibe una mayor estabilización derivada del componente electrostático comparada con la pose-2 (-18,1 y -12 kcal/mol, respectivamente). La conformación representativa para este modo de unión se presenta en la figura 2.19a, la cual muestra que la principal fuerza que conduce a la formación del complejo la constituye la interacción de puentes de hidrógeno entre el oxígeno de la porción sulfonamida y el grupo hidroxilo unido a C3 de la β CD. Esta interacción intermolecular, se estableció alrededor de los 6 ns y persiste a lo largo de la simulación. Esta pose de unión predicha fue consistente con los $\Delta\delta$ determinadas por estudios de ^1H NMR (tabla 2.5), en la cual, el efecto de desapantallamiento ($\Delta\delta$ positivo) en H_3 fue a causa de la electronegatividad de la porción sulfonamida, mientras que el efecto de apantallamiento ($\Delta\delta$ negativo) sobre H_5 se produjo por el sistema rico en electrones del anillo B de la HCT, el cual se introdujo profundamente en la cavidad de la β CD.

Tabla 2.10: Resultados obtenidos de los análisis de descomposición energética de las trayectorias de dinámica molecular y la dependencia de la temperatura de los componentes energéticos para la formación del complejo de inclusión HCT/ β CD. Se resaltan las poses más favorables para cada especie.

| Especies de HCT | T (°C) | elect ^a | vdW ^b | Gas ^c | Solv ^d | ΔG^e |
|--------------------------|--------|--------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------|
| HCT neutra pose-1 | 25 | -18,1 | -24,5 | -42,7 | 23,5 | -19,1 |
| | 37 | -14,0 | -27,9 | -42,0 | 23,8 | -18,2 |
| | 45 | -10,9 | -26,3 | -37,2 | 21,2 | -16,0 |
| HCT neutra pose-2 | 25 | -12,0 | -25,9 | -37,9 | 21,9 | -16,0 |
| HCT mono-ionizada pose-1 | 25 | -25,8 | -25,4 | -50,5 | 38,7 | -11,8 |
| HCT mono-ionizada pose-2 | 25 | -26,8 | -24,4 | -51,2 | 36,0 | -15,2 |
| | 37 | -28,0 | -24,3 | -52,3 | 37,2 | -15,1 |
| | 45 | -26,7 | -24,1 | -50,9 | 37,8 | -13,1 |
| HCT di-ionizada pose-1 | 25 | -77,1 | -24,4 | -101,4 | 88,6 | -12,8 |
| | 37 | -84,1 | -23,4 | -107,5 | 93,7 | -13,8 |
| | 45 | -66,8 | -17,3 | -84,1 | 76,9 | -7,1 |
| HCT di-ionizada pose-2 | 298 | -66,2 | -16,3 | -82,5 | 73,4 | -9,2 |

a) Componente de interacción electrostática (kcal/mol). b) Componente de interacción de van der Waals (kcal/mol). c) Energía de interacción en la fase gaseosa (kcal/mol). d) Energía de desolvatación (kcal/mol). e) Energía de unión estimada (kcal/mol).

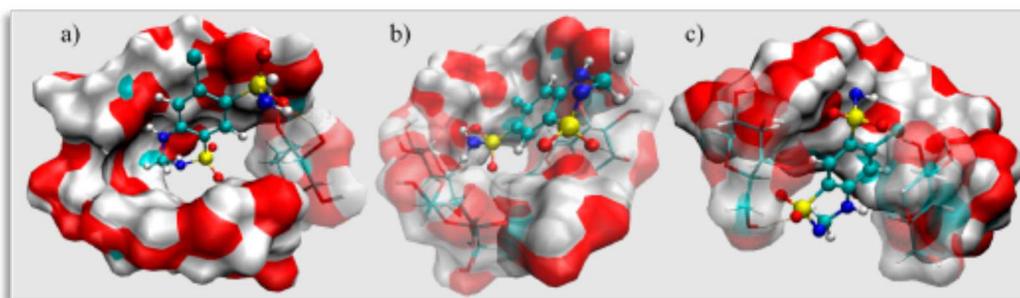


Figura 2.19: Arreglo tridimensional del modo de unión entre β CD y a) HCT neutra, b) HCT mono-ionizada, c) HCT di-ionizada. Las estructuras representan la conformación más frecuente determinada por un algoritmo de clustering basado en el RMSD de las correspondientes trayectorias de dinámica molecular.

Cuando se analizó el modo de unión de la forma mono-ionizada de la HCT (figura 2.20b), el gráfico de RMSD en función del tiempo muestra que el complejo correspondiente a la pose-1 se mantiene relativamente estable después de ser calentado y de la fase de equilibrio, mientras que la pose-2 exhibe mayor variación estructural que la pose-1 (figura 2.18). Después de realizar los análisis de descomposición energética (5000 – 55000 pasos), se encontró que la pose-2 mostró mayor afinidad que la pose-1 (-15,2 y -11,8 kcal/mol, respectivamente). En ambos casos, la especie mono-ionizada exhibió menor afinidad que la especie neutra. A partir de un análisis de *clustering* sobre la trayectoria de DM correspondiente a la pose-2, se obtuvo la conformación más poblada (figura 2.19b), la cual fue significativamente diferente a la obtenida para la HCT neutra (figura 2.19a), donde la mitad sulfonamida se encuentra ahora orientada hacia el borde más angosto de la β CD, estableciéndose interacciones de puente hidrógeno estables entre el grupo amino y el oxígeno del puente 1,4 glicosídico. La proximidad del grupo amino a H₃ y H₅, a lo largo con la inserción del anillo aromático dentro de la cavidad hidrofóbica, es consistente con el efecto de apantallamiento observado por ¹H NMR para ambos átomos (tabla 2.5).

Con respecto a las especies di-ionizadas de la HCT, el gráfico de RMSD en función del tiempo (figura 2.18) nuevamente demostró un rearrreglo significativo del complejo inicial, alcanzado el equilibrio después de los 6 ns (30000 pasos) de simulación. El análisis de descomposición energética se realizó entre los 3 y los 6 ns de simulación (tabla 2.10), lo cual revela que la pose-1 mostró mayor afinidad que la pose-2 (-12,8 y -9,2 kcal/mol, respectivamente), con estas especies exhibiendo una menor afinidad que cualquiera de las especies mono-ionizada o neutra de la HCT. La estructura obtenida a partir del análisis de *clustering* de la pose-1 (figura 2.19c) muestra que la HCT se insertó profundamente dentro de la cavidad de la β CD, estableciendo interacciones por puente de hidrógeno con ambos bordes, el ancho y el angosto, de la molécula receptora. El gran efecto de apantallamiento en H₃ y H₅, observado en los espectros de ¹H NMR, se atribuyó a la disposición perpendicular del anillo aromático, rico en electrones, con respecto a los protones interiores de la β CD.

De los resultados anteriores, se puede observar que las predicciones de afinidad para los tres estados de ionización de la HCT analizados, están de

acuerdo con las observaciones experimentales obtenidas por ITC y DSF (tabla 2.6). Es notable que la energía de estabilización derivada de las interacciones de van der Waals permanecen sin cambios para los distintos estados de ionización de HCT. En línea con estas observaciones, la idea de que la energía de solvatación puede limitar la afinidad general observada en los complejos de inclusión de β CD, ya han sido reportadas por nuestro grupo de investigación (Zoppi y col., 2010; Zoppi y col., 2008).

2.3.2.3 Afinidad en Función de la Temperatura

Se estudió el efecto de la temperatura en la afinidad de HCT hacia la β CD por ambos métodos, experimental y teórico. Como una visión conjunta general, la afinidad observada fue altamente dependiente del estado de ionización de la HCT. Para la HCT neutra, ocurre un marcado decrecimiento en la afinidad por la cavidad de la β CD a medida que aumenta la temperatura, mientras que para cualquiera de las especies mono-ionizadas o di-ionizadas de la HCT, no se observaron cambios significativos (tabla 2.6). El valor de la constante de estabilidad calculada experimentalmente, está directamente relacionada con la afinidad de la HCT por la cavidad de la β CD, es decir, que a mayor valor de la constante de estabilidad, mayor es la afinidad entre ambos componentes.

Estos resultados sugieren que la dependencia de la afinidad con la temperatura origina diferencias en los modos de inclusión de la HCT dentro de la cavidad de la β CD. La tabla 2.6 muestra las constantes de estabilidad obtenidas por los análisis de DSF y por ITC. La tabla 2.10 presenta los componentes energéticos correspondientes como los determinados por la trayectoria de dinámica molecular, usando diferentes temperaturas para el modo de inclusión más estable de la HCT. Se pudo observar que, para la HCT neutra, los componentes electrostáticos fueron altamente dependientes de la temperatura, con un marcado decrecimiento cuando se incrementó la temperatura (-18,1; -14,0 y -10,9 kcal/mol a 25, 37 y 45 °C, respectivamente), lo cual tiene consistencia con el decrecimiento de los valores de ΔH determinados por ITC (tabla 2.3). Lo encontrado también sugiere que, cuando la temperatura se elevó, la HCT permaneció incluida en la cavidad de la β CD, como se

demuestra por el hecho de que la componente de van der Waals se mantuvo sin cambios significativos (-24,5; -27,9 y -26,3 kcal/mol a 25, 37 y 45 °C, respectivamente).

El análisis de los enlaces de puente de hidrógeno demuestran que, existe un cambio significativo en el modelo de enlaces de hidrógeno formados a diferentes temperaturas para este complejo, con la interacción principal de puentes de hidrógeno que se establece entre el oxígeno (O₂) del grupo sulfonamida y el C₃OH del el borde ancho de la βCD a 25 °C (ocupación del 27,7 %) (figura 2.20a). Esta “ocupación” que se define, hace referencia a la interacción por puente de hidrógeno, lo cual significa que del 100% del tiempo de trayectoria simulado, el 27,7% del tiempo se encuentra establecido el enlace por puente hidrógeno.

A 37 °C, la HCT neutra se introdujo profundamente en la cavidad de la βCD, y en ese caso, el contacto principal de puente de hidrógeno se estableció entre los grupos N-H del anillo benzotiadiazina de la HCT y H₆ de la βCD (figura 2.20b). La ocupación calculada fue significativamente menor (16,7%), la cual a su vez llevó a un decrecimiento en la componente electrostática comparado al obtenido a 25 °C (-14,0 y -18,1 kcal/mol, respectivamente). A la mayor temperatura ensayada (45 °C), la interacción de puentes de hidrógeno, entre la mitad sulfonamida de la HCT y el O-H del borde ancho de la βCD, fue nuevamente identificado como el principal contacto de estabilización del complejo de inclusión (figura 2.20c). Esta interpretación mostró la menor ocupación de las tres temperaturas estudiadas (8,2%), lo cual es consistente con la significativa baja en la afinidad de la HCT por la cavidad de la βCD.

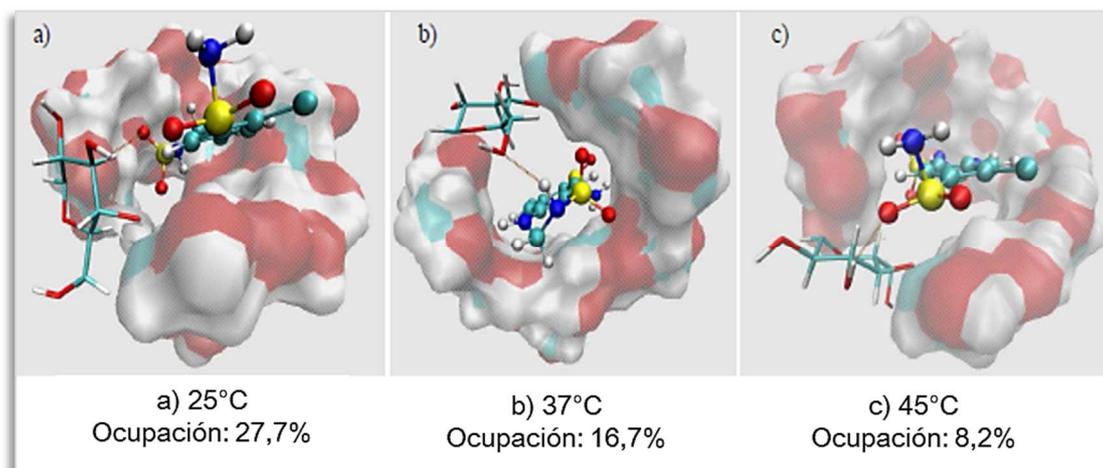


Figura 2.20: Interacción entre la HCT neutra y la β CD a distintas temperaturas y el porcentaje de ocupación en cada caso. a) 25 °C. b) 37 °C. c) 45 °C.

Cuando se analizó la HCT en su estado mono-ionizado (figura 2.21), no se observaron cambios significativos en los arreglos tridimensionales del complejo como consecuencia de un aumento de la temperatura. Los análisis de puente de hidrógeno demostraron que, en todos los casos se establecieron interacciones de puentes de hidrógeno estables entre el oxígeno del grupo sulfonamida de la HCT y el C₃OH del borde ancho de la β CD, cuya ocupación no mostró dependencia significativa con la temperatura (70,9%; 76,5% y 68%, a 25, 37 y 45 °C, respectivamente). Esta observación fue consistente con la estabilidad del componente electrostático calculado para las tres temperaturas ensayadas (tabla 2.5). Basado en los valores de pKa de la HCT, se considera que las especies mono-ionizadas estaban en su mayoría presentes entre pH 8 y 9, el cual fue consistente con los valores de estabilidad relativa de HCT por β CD reportados en la tabla 2.5 para ese rango de pH. Finalmente, las especies di-ionizadas, (figura 2.22), tiene un comportamiento similar al observado para la especie mono-ionizada, formando enlaces de puentes de hidrógenos estables a ambos bordes de la molécula de β CD, lo cual estuvo nuevamente en concordancia con los valores de estabilidad experimental determinado a pH 10.

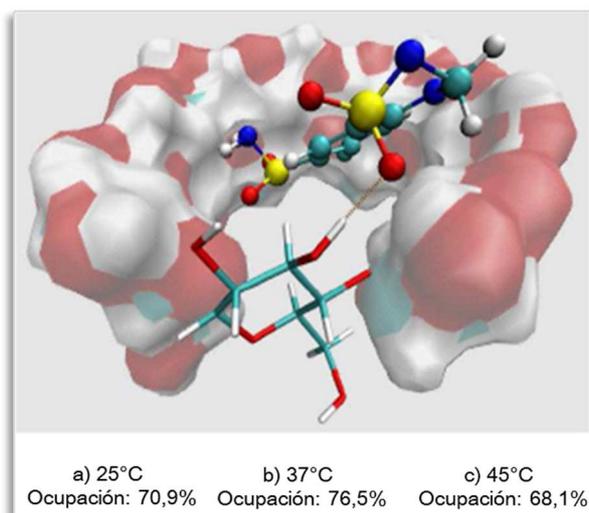


Figura 2.21: Interacción entre la HCT mono-ionizada y la β CD a distintas temperaturas y el porcentaje de ocupación en cada caso.
a) 25 °C. b) 37 °C. c) 45 °C.

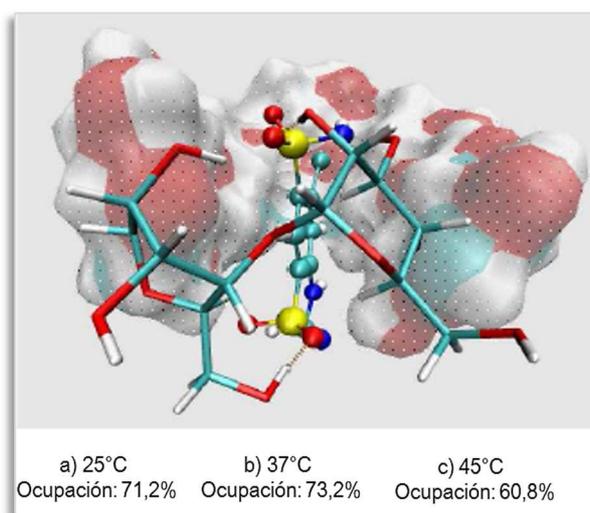


Figura 2.22: Interacción entre la HCT di-ionizada y la β CD a distintas temperaturas y el porcentaje de ocupación en cada caso.
a) 25 °C. b) 37 °C. c) 45 °C.

2.3.3 Discusión Final de Resultados y Conclusiones Parciales

Los estudios de *docking* se realizaron considerando los tres estados de ionización posibles de la HCT estableciéndose dos posibles poses de unión para cada una de las especies de la HCT: neutra, mono- y di-ionizada. Se observó

que las formas mono- y di-ionizadas presentaron un modo de unión a la β CD similar al de la HCT neutra. De las simulaciones de DM se observó un marcado rearrreglo conformacional en la β CD como consecuencia de la inclusión de la HCT. En todos los casos se observó que el fármaco se incluye completamente en la cavidad de la β CD, variando la orientación según su estado de ionización y estabilizándose mediante interacciones electrostáticas y de Van der Waals.

El aumento en el grado de ionización de la HCT disminuyó la afinidad por la β CD, lo cual se encuentra asociado al costo energético para desolvatar la HCT en solución. Se encontró una fuerte dependencia entre la afinidad y la temperatura, observándose que a medida que aumenta la temperatura, la constante de estabilidad calculada fue menor, lo cual fue atribuido a aspectos conformacionales y modificaciones en los enlaces de hidrógeno entre HCT y β CD.

La influencia del pH y la temperatura en la estabilidad del complejo HCT/ β CD fue descrita en detalle y elucidada a nivel molecular, estableciéndose una adecuada correlación entre los aspectos estructurales identificados mediante metodologías teóricas y los resultados experimentales obtenidos por las técnicas de DSF, ITC y ^1H NMR.

RESUMEN FINAL Y CONCLUSIONES GENERALES

La HCT es un fármaco que pertenece a la clase 4 del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, por lo tanto tiene baja solubilidad y baja permeabilidad intestinal. Existen numerosas estrategias para mejorar estas características desfavorables, una de ellas es la utilización de CD. La CD tiene una cavidad hidrofóbica, capaz de albergar en su interior una molécula poco soluble en agua. Particularmente, se utilizó la β CD ya que es la más conveniente en cuanto al tamaño, propiedades y costo.

El complejo formado, fue ampliamente caracterizado, realizándose estudios en estado líquido, sólido y cálculos teóricos.

En estado líquido se realizaron estudios de DSF, ITC y ^1H NMR. Estas técnicas evidenciaron la formación de un complejo de inclusión de estequiometría 1:1 entre la HCT y la β CD. Tanto las técnicas de DSF como de ITC, demostraron que se forma un complejo débil, ya que las constantes de estabilidad son pequeñas y que a su vez, disminuyen a medida que aumenta la temperatura y el grado de ionización del IFA. Por medio del análisis de los espectros de ^1H NMR, se pudo establecer el tipo de interacción que ocurre entre ambos componentes y cómo ingresa la molécula del IFA a la cavidad hidrofóbica de la CD. Se postula que la HCT ingresa completamente en la cavidad de la β CD.

En estado sólido, se llevó a cabo la caracterización por medio de análisis térmico (DSC/TGA), FT-IR y ensayos de disolución. Tanto el análisis térmico como el FT-IR, demostraron la formación de una nueva especie química ya que tanto las curvas como los espectros de absorción obtenidos, fueron diferentes a los de los componentes puros. Por medio de los ensayos de disolución, se pudo determinar que la velocidad de disolución de la HCT fue significativamente mayor en comparación a la de HCT pura, lo cual indicó que, por medio de la estrategia utilizada, se logró mejorar una de las características biofarmacéuticas desfavorables del fármaco en estudio.

Estas investigaciones experimentales fueron complementadas con estudios teóricos. Los estudios de modelado molecular se llevaron a cabo por medio de

docking molecular y dinámica molecular. Se obtuvo una muy buena correlación entre los resultados teóricos y los experimentales.

En resumen, el complejo de inclusión entre la HCT y la β CD obtenido presentó una estequiometría 1:1, con una constante de estabilidad fuertemente afectada por la temperatura y el estado de ionización de la HCT. El mismo es capaz de aumentar la solubilidad y la velocidad de disolución de la HCT.

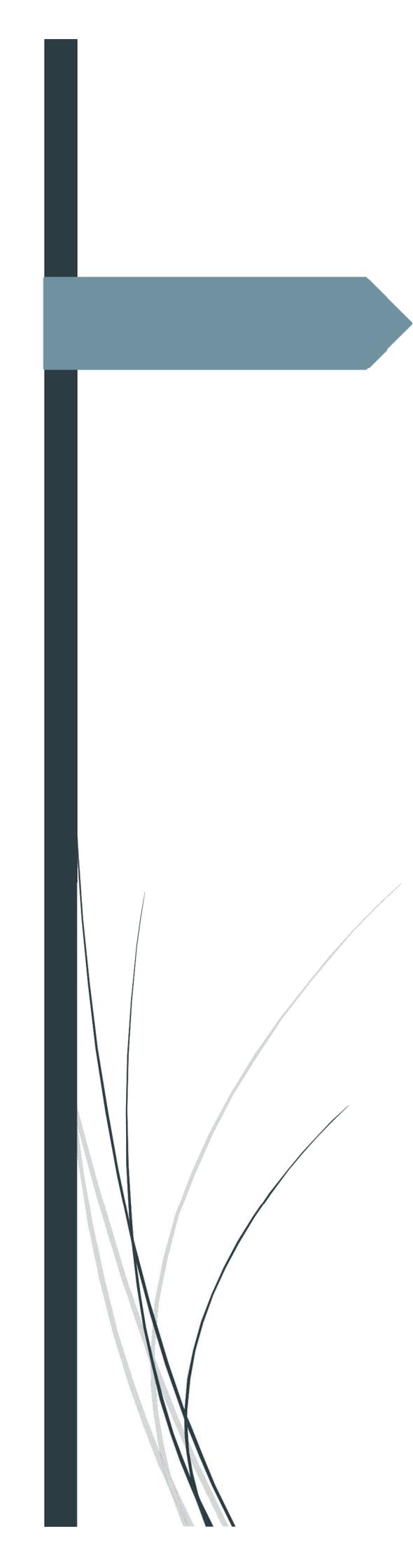
BIBLIOGRAFÍA (en orden alfabético)

- Allouche, A. R. (2011). A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. *J Comput. Chem.*, 32(1), 174 – 182.
- Amidon, G.L.; Lennernäs H., Shah V.P., C. J. R. (1995). A theoretical basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability.
- Bonini, M., Rossi, S., Karlsson, G., Almgren, M., Lo Nostro, P., & Baglioni, P. (2006). Self-assembly of beta-cyclodextrin in water. Part 1: Cryo-TEM and dynamic and static light scattering. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 22(4), 1478–1484.
- Case, D.A.; Cheatham, T.E. III; Darden, T.; Gohlke, H; Luo, R.; Merz, K.M., Jr; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput. Chem.*, 26(16), 1668 – 1688.
- Čudina, O., Karljiković-Rajić, K., Ruvarac-Bugarčić, I., & Janković, I. (2005). Interaction of hydrochlorothiazide with cationic surfactant micelles of cetyltrimethylammonium bromide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 256(2-3), 225–232.
- de Sousa, F. B., Denadai, Â. M. L., Lula, I. S., Lopes, J. F., Dos Santos, H. F., De Almeida, W. B., & Sinisterra, R. D. (2008). Supramolecular complex of fluoxetine with β -cyclodextrin: An experimental and theoretical study. *International Journal of Pharmaceutics*, 353(1-2), 160–169.
- Dodziuk, H. (2006). *Cyclodextrins and their complexes*. (H. Dodziuk, Ed.). Weinheim: Wiley-VCH.
- EMA. (2010). *Guideline on the investigation of bioequivalence. Committee for Medicinal Products for Human Use (CMPH)*. London.
- FDA, F. and D. A. (2001). Guidance for Industry: Waiver for in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system. (Department). Rockville (MD).
- FDA, U. (2000). Guidance for Industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. *Washington DC: US Department of Health and Human Services*, (May 2015). Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Guidance+for+Industry+Waiver+of+In+Vivo+Bioavailability+and+bioequivalence+studies#0>

- Fermeglia, M., Ferrone, M., Lodi, A., & Pricl, S. (2003). Host-guest inclusion complexes between anticancer drugs and beta-cyclodextrin: Computational studies. *Carbohydrate Polymers*, *53*(1), 15–44.
- Fisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman J.R.; Montgomery, J.A.; Vreven, Jr. T; Kudin, K.N.; Burant, J.C., et al. (2004). Gaussian 03, Revision C.0.2. *Gaussian, Inc, Wallingford CT*.
- Fred, 2.2.5. OpenEye Scientific Software, S. F. Fred, 2.2.5.
- Giordano, F., Novak, C., & Moyano, J. R. (2001). Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, *380*(2), 123–151. [http://doi.org/10.1016/S0040-6031\(01\)00665-7](http://doi.org/10.1016/S0040-6031(01)00665-7)
- Goodman Gilman A. (2011). *Goodman y Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (R. R. . Hardman, J.G., Limbird L.E., Molinoff P.B., Ed.).
- Hawkings, P.C.; Skillman, A.G.; Warren, G.L.; Ellingson, B. A.; Stahl, M. T. (2010). Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. *J Chem Inf Model*, *50*(4), 572 – 584.
- Higuchi, T., Connors, K. (1965). *Phase-Solubility Techniques en Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*. New York.
- Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. (1996). No Title. *J Mol Graph*, *14*(1), 33 – 38.
- Illapakurthy, A. C., Wyandt, C. M., & Stodghill, S. P. (2005). Isothermal titration calorimetry method for determination of cyclodextrin complexation thermodynamics between artemisinin and naproxen under varying environmental conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *59*(2), 325–332.
- Indyk, L.; Fischer, H. F. (1998). Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. In *Methods in Enzymology. Vol 295* (pp. 350 – 364). New York.
- Kirschner, K.N.; Yongye, A.B.; Tschampel, S.M.; González - Outeriño, J.; Daniels, C.R; Foley, B.L.; Woods, R. J. (2008). *J Comput Chem*, *29*(4), 622 – 655.
- Kuhn, B.; Gerber, P; Schulz - Gasch, T.; Stahl, M. J. (2005). *J Med Chem*, *48*, 4040 – 4048.
- Leuner, C., & Dressman, J. (2000). Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, *50*(1), 47–60.
- McGann, M. J. (2012). FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *8*(26), 1 – 10.

- McGann, M. J. . (2011). FRED pose prediction and virtual screening accuracy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(3), 578 – 596.
- Messner, M., Kurkov, S. V., Jansook, P., & Loftsson, T. (2010). Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 387(1-2), 199–208.
- Mora, M. J., Tártara, L. I., Onnainty, R., Palma, S. D., Longhi, M. R., & Granero, G. E. (2013). Characterization, dissolution and in vivo evaluation of solid acetazolamide complexes. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 380–390.
- Mura, P. (2015). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state : A review, 1–13.
- Neal, M. J. (2007). *Farmacología médica en esquemas* (Quinta). CTM Servicios Bibliográficos S.A.
- Omega 2.4.3. Software. OpenEye Scientific Software, S. F. Omega 2.4.3. Software. Santa Fe, NM.
- OMS. (2006). *Multisource (generic) pharmaceutical products: Guidelines on registration requirements to establish interchangeability*.
- OpenEye Scientific Software. (n.d.). OpenEye Scientific Software.
- Pouton, C. W. (2006). Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(3-4 SPEC. ISS.), 278–287. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.04.016>
- Sun, D. Z., Li, L., Qiu, X. M., Liu, F., & Yin, B. L. (2006). Isothermal titration calorimetry and ¹H NMR studies on host-guest interaction of paeonol and two of its isomers with beta-cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, 316(1-2), 7–13.
- Terekhova, I., Chibunova, E., Kumeev, R., Kruchinin, S., Fedotova, M., & Gierycz, P. (2015). Specific and nonspecific effects of biologically active inorganic salts on inclusion complex formation of cyclodextrins with aromatic carboxylic acids, 122, 97–103.
- Turnbull, W.B.; Daranas, A. H. (2003). On the Value of c: Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? *J Am Chem Soc*, 125(48), 14859 – 14866.
- VIDA, 4.1.2. OpenEye Scientific Software, S. F. VIDA, 4.1.2.
- Wang, J.; Wolf, R.M.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A.; Case, D. A. (2004). Development and testing of a general Amber force field. *J Comput Chem*, 25(9), 1157 – 1174.

- Xie, F., Ji, S., & Cheng, Z. (2015). European Journal of Pharmaceutical Sciences In vitro dissolution similarity factor (f_2) and in vivo bioequivalence criteria , how and when do they match.Using a BCS class II drug as a simulation example, *66*, 163–172.
- Zakeri-Milani, P., Barzegar-Jalali, M., Azimi, M., & Valizadeh, H. (2009). Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *73*(1), 102–106.
- Zielenkiewicz, W., Terekhova, I. V., Wszelaka-Rylik, M., & Kumeev, R. S. (2010). Thermodynamics of inclusion complex formation of hydroxypropylated β - And β -cyclodextrins with aminobenzoic acids in water. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *101*(1), 15–23.
- Zoppi A. , Quevedo M.A., Delrivo A., L. M. R. (2010). Complexation of sulfonamides with β -cyclodextrin studied by experimental and theoretical methods. *J Pharm Sci*, *99*(7), 3166 – 3176.
- Zoppi, A., Quevedo, M.A., Longhi, M. R. (2008). Specific binding capacity of β -cyclodextrin with cis and trans enalapril: Physicochemical characterization and structural studies by molecular modeling. *Bioorg Med Chem*, *16*(18), 8403 – 8412.



Desarrollo, Caracterización y Evaluación de Nanopartículas Poliméricas

Capítulo 3

Farm. Renée Onnainty
TESIS DOCTORAL

Capítulo 3:

DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN y EVALUACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

INTRODUCCIÓN

La vía oral es atractiva para la administración de fármacos porque está asociada a la conveniencia, a la conformidad por parte del paciente y al bajo costo. Sin embargo, existen numerosos principios activos con baja biodisponibilidad cuando son administrados por esta vía. Entre otras razones, la baja biodisponibilidad puede estar relacionada con uno o más de los siguientes efectos que pueden sufrir los fármacos:

- Baja permeabilidad o permeabilidad restringida a cierta parte del intestino.
- Baja solubilidad en el medio acuoso del lumen del tracto gastrointestinal (TGI).
- Falta de estabilidad dentro del intestino (barreras enzimáticas, inestabilidad química, etc).

Con el objetivo de minimizar estos inconvenientes, un significativo número de estudios han demostrado el potencial uso de nanopartículas (NPs) poliméricas como sistemas de liberación para la administración oral de fármacos con baja absorción intestinal. Entre las principales características que tienen estos sistemas encontramos la habilidad de las NPs poliméricas para desarrollar interacciones bioadhesivas con la mucosa intestinal (Agüeros y col., 2009); propiedad que posibilita aumentar el tiempo de permanencia de los fármacos en el sitio de absorción, lo que favorecería su biodisponibilidad.

➤ Nanopartículas

Con el fin de resolver o minimizar los inconvenientes que presentan los fármacos insolubles o poco permeables, un significativo número de estudios han demostrado el potencial que tienen las nanopartículas poliméricas como sistemas de liberación para la administración oral de fármacos pobremente absorbidos. Todos estos hallazgos están sustentados por las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de estos transportadores (Agüeros y col., 2009).

Las NPs se definen como partículas de tamaño inferior a 1 μm , las más utilizadas generalmente tienen un tamaño de entre 10 y 500 nm, elaboradas a partir de materiales poliméricos de diferente naturaleza. El método de fabricación, la composición química de éstos y la naturaleza del ligando, en caso que lo posea, influenciarán su funcionalidad y efectividad (Gómez-gaete, 2014).

La obtención de NPs, en un rango de tamaños entre 50-300 nm, para la liberación de fármacos, se puede alcanzar por dos vías. La primera es rompiendo las partículas hasta lograr un tamaño nano, la segunda es construyendo partículas desde las moléculas. Estos modelos se esquematizan en la figura 3.1 (Grupta RB, 2006). Estos sistemas ofrecen grandes posibilidades para mejorar la seguridad y la eficacia de numerosos fármacos.

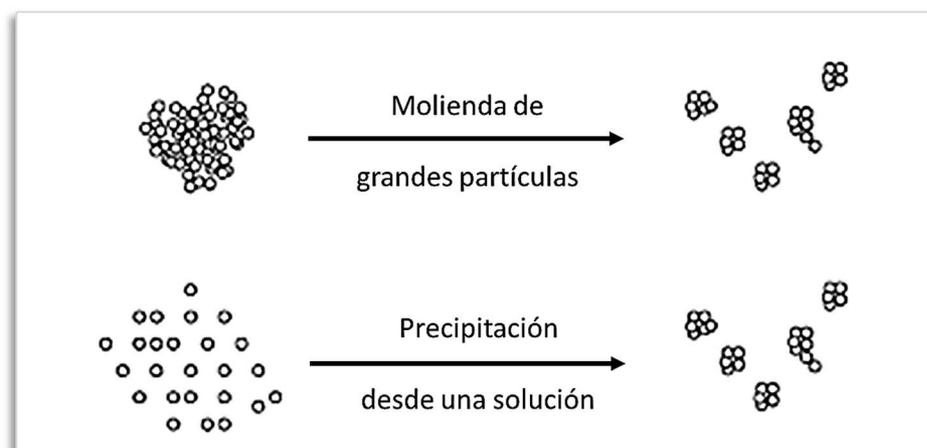


Figura 3.1: Esquematización de mecanismos empleados para obtener nanopartículas.

❖ La molienda de grandes partículas o proceso de ruptura, para la obtención de NPs es uno de los mecanismos más viejos utilizados para la reducción de sólidos y para producir una gran cantidad de materiales particulados. En este procedimiento, el material es sometido a estrés, el cual resulta en la ruptura de la partícula.

❖ En la precipitación desde una solución o el proceso de construcción, el polímero se disuelve en un solvente hasta conseguir una solución. El precipitado de NPs se obtiene por la remoción rápida del solvente o por el agregado de un antisolvente a la solución, reduciendo la solubilidad del polímero en el medio. Inicialmente, se forma un núcleo, el cual crece por la condensación o coagulación.

Entre las ventajas que aportan las nanopartículas se pueden citar:

- La capacidad para proteger a las moléculas encapsuladas frente a su eventual degradación, desde el momento de la administración en el paciente hasta que alcanza su lugar de acción o absorción.
- La capacidad para atravesar las barreras biológicas como la piel, las mucosas gastrointestinales o respiratorias, como así también, la barrera hematoencefálica.
- La capacidad para alcanzar el órgano, tejido o grupo celular diana donde la molécula debe ejercer su acción.
- La capacidad para alcanzar compartimentos intracelulares.
- La capacidad para controlar la liberación de la molécula activa en su lugar de acción o absorción.

Por otra parte, aunque la nanotecnología está cambiando la forma y las maneras de diseñar los sistemas de administración y transporte de los fármacos, no se pueden olvidar los numerosos problemas y desafíos que representa su utilización. En el ámbito biomédico, también debe considerarse un amplio abanico de cuestiones importantes relativas con el procesamiento y la reproducibilidad de las nanopartículas, así como aspectos relacionados con la biocompatibilidad, la respuesta inmune y la seguridad a largo plazo (Irache, 2008).

➤ Quitosano

El quitosano (CHI), es un co-polímero lineal de enlaces β -(1-4) de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. Debido a su estructura única, el CHI posee numerosas características favorables, tales como la biocompatibilidad, biodegradabilidad, efecto aumentador de la permeabilidad, propiedades catiónicas, etc. Estas ventajas hacen que el CHI sea ampliamente utilizado en el campo farmacéutico y en ingeniería de tejidos.

Las NPs a base de CHI se forman como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento, en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas, ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente. En estas NPs el fármaco puede estar atrapado o ligado a la matriz polimérica sólida. Las metodologías más comunes, mediante las cuales es posible sintetizar NPs, se presentan en la figura 3.2 (Goycoolea y col., 2009).

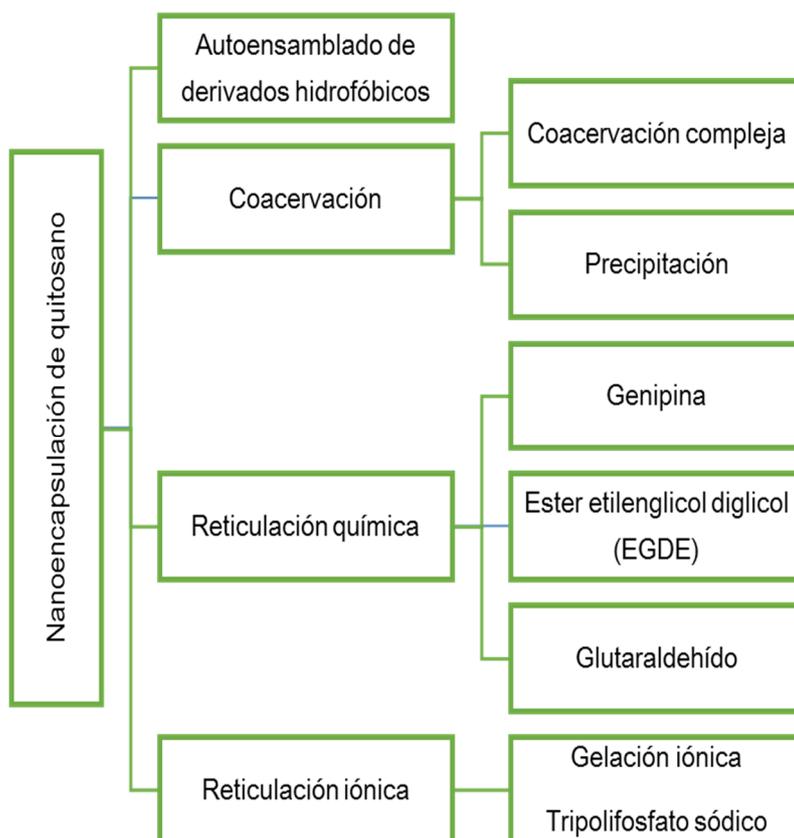


Figura 3.2: Métodos para la obtención de nanopartículas de quitosano.

Dentro de los métodos presentados en la figura 3.2, el de la **gelación iónica** ha sido el más desarrollado. Entre las ventajas que presenta esta técnica, cabe destacar que evita el uso de altas temperaturas, solventes orgánicos y procesos drásticos como el ultrasonido. Además, la naturaleza policatiónica del CHI le confiere a estos sistemas, la capacidad para asociar de forma eficiente fármacos, preservando la estabilidad y la bioactividad de los principios activos. La gelación iónica se basa en la interacción iónica entre las cargas positivas de los grupos aminos primarios del CHI y las cargas negativas de un agente entrecruzante, tal como el tripolifosfato de sodio (TPP), el cual es una sustancia no tóxica y con propiedades multivalentes (Fan y col., 2012). La formación de las NPs se esquematiza en la figura 3.3.

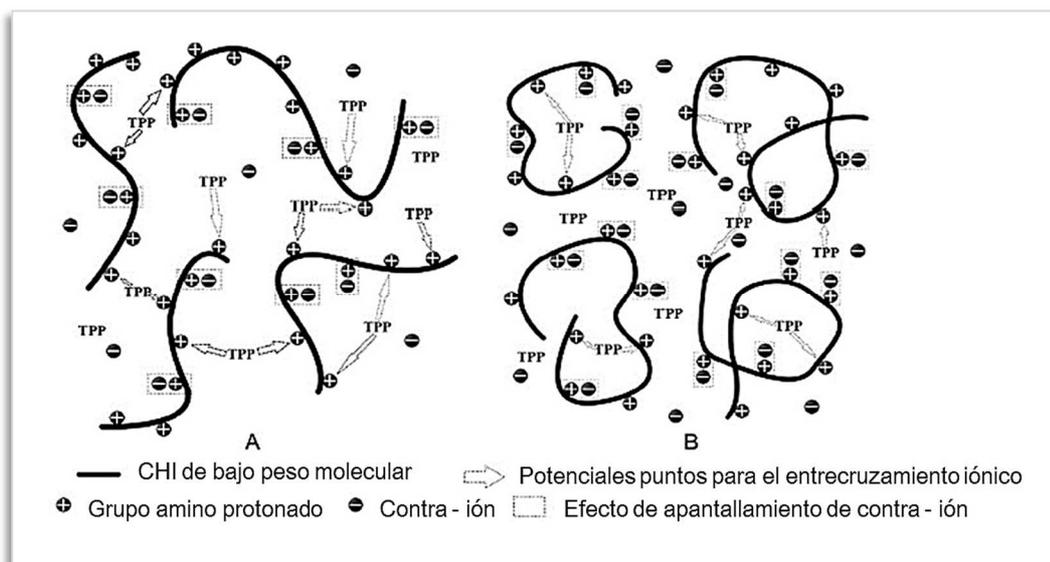


Figura 3.3: Esquemática del proceso de gelación iónica.

En los últimos años, las NPs de **CHI de bajo peso molecular**, han demostrado un gran potencial en la aplicación de liberación de fármacos. Esto se debe a que este tipo de CHI tiene buena solubilidad en medio ácido, propiedades catiónicas, características bioadhesivas y propiedades como aumentador de la permeabilidad (Fan y col., 2012).

➤ Objetivos

El objetivo de esta investigación fue obtener NPs de CHI para la administración oral de fármacos. Teniendo en cuenta que previamente se obtuvo un complejo de inclusión HCT/ β CD (Onnainty y col., 2013), se decidió combinar las propiedades de las ciclodextrinas (CDs) con las NPs, con el objetivo de aumentar la incorporación de IFAs poco solubles en agua a estos sistemas transportadores. Por lo tanto, se utilizó como fármaco modelo a la HCT acomplejada con β CD.

Para llevar a cabo este objetivo, se realizaron las actividades que se describen a continuación.

Parte I: Obtención y caracterización físico-química de las NPs

Las NPs de CHI se obtuvieron utilizando la técnica de gelación iónica, usando TPP como agente entrecruzante. Las condiciones óptimas de síntesis se seleccionaron evaluando diferentes combinaciones de concentraciones de los componentes puros y variando la temperatura de reacción.

Las NPs se caracterizaron en cuanto a su tamaño y carga superficial utilizando la técnica de *dynamic light scattering* (DLS). La estabilidad de las NPs se estudió a distintos valores de pH, durante 20 días, a temperatura ambiente, simulando condiciones de almacenamiento. La morfología se determinó por microscopía electrónica de barrido (SEM). La detección del principio activo, presente en el sistema, se realizó por SEM acoplado a espectroscopía de rayos X.

Las NPs se cargaron con el complejo de inclusión HCT/ β CD. Las mismas se aislaron utilizando una ultracentrífuga. La cantidad de fármaco encapsulado se determinó por medio de un método indirecto, el cual consistió en cuantificar la cantidad de IFA presente en el sobrenadante, utilizando para dicha cuantificación un espectrofotómetro UV-Vis. Se realizaron estudios de liberación *in vitro*, utilizando la técnica de diálisis en tubos de membrana de celulosa.

Parte II: Evaluación biofarmacéutica de las NPs

Se evaluaron las propiedades bioadhesivas de las NPs utilizando dos técnicas diferentes, aunque ambas involucraron mucina gástrica porcina. La primera, denominada método de la mucina, consiste en medir el Potencial Z de superficie de las NPs antes y después de que éstas interactuaran con una suspensión de mucina. La segunda técnica de evaluación se llevó a cabo usando microscopía diferencial de barrido, la cual se basa en detectar cambios en la estructura de la mucina, luego de que ésta se pone en contacto con un material mucoadhesivo como son las NPs.

Se realizaron estudios de permeabilidad *in vitro*, utilizando la técnica de saco intestinal evertido de ratas. Se evaluó la viabilidad *ex vivo* del tejido intestinal en las condiciones de ensayo, para lo cual se determinó la capacidad de concentración de glucosa de los segmentos intestinales aislados en medio de cultivo TC199.

Para la cuantificación del fármaco se desarrolló una técnica bioanalítica, que involucró la extracción en fase sólida de HCT para su posterior cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución. El procedimiento fue exhaustivamente validado.

Los tejidos, utilizados en los ensayos de permeabilidad, se sometieron a estudios toxicológicos a nivel histológico, utilizando para dicho fin, la microscopía óptica de alta resolución (MOAR) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM).

➤ **Materiales**

La HCT, se compró en Parafarm (Buenos Aires, Argentina) y se utilizó sin previa purificación.

La β CD, fue donada por Ferromet S.A. (agente de Roquette en Argentina).

El CHI de bajo peso molecular, 75 – 85% deacetilado, se adquirió en Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina).

El TPP se adquirió en Todo Droga (Córdoba, Argentina).

La Cafeína, se adquirió en Parafarm (Buenos Aires, Argentina).

La Mucina de estómago de cerdo utilizada para los estudios de mucoadhesión y el medio de cultivo TC199 (Medium 199) utilizado en los estudios de permeabilidad se adquirieron en Sigma Aldrich, (Buenos Aires, Argentina).

El kit Glicemia enzimática AA, se adquirió de Wiener lab, Rosario, Argentina.

Los animales se adquirieron del bioterio del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (Córdoba, Argentina)

Todos los experimentos se realizaron con Metanol y Acetonitrilo grado HPLC.

El agua utilizada en todos los estudios fue Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). Se utilizaron soluciones tamponadas de fosfatos para controlar el valor del pH del medio.

PARTE I: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

3.1.1 Instrumental

Las muestras se pesaron en una balanza analítica Voyager Ohaus modelo Explorer E01140 y se solubilizaron con la ayuda de un ultrasonicador Elma S 40 Elmasonic.

El pH se determinó utilizando un pH-metro Hanna instrument HI 255 combined meter.

Las mediciones de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis. Se emplearon celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico Hëllma Analytics.

El tamaño y el potencial Z se determinaron utilizando un equipo de Dispersión Dinámica de la Luz, (Dynamic Light Scattering, DLS), Beckman Coulter Delsa Nano C, con láser He-Ne 633 nm.

Las imágenes de los sistemas en estudio para el análisis en cuanto a su morfología, fueron obtenidas con microscopio electrónico de barrido (SEM) SUPRA™ 40 (ZEISS); y los estudios de mucoadhesión fueron realizados utilizando FE-SEM Sigma. Para corroborar la presencia de HCT en las NPs se utilizó un FE-SEM Sigma acoplado a EDX, Lamarx.

3.1.2 Métodos

3.1.2.1 Obtención de Nanopartículas

Las NPs se obtuvieron utilizando la técnica de gelación iónica. Como se mencionó en la introducción, esta técnica se basa en la interacción iónica entre las cargas positivas de los grupos aminos primarios del CHI de bajo peso molecular y las cargas negativas de un agente entrecruzante, tal como el TPP.

El CHI es un compuesto insoluble en agua, por lo cual debe disolverse en una solución acuosa de ácido acético, cuatro veces más diluido que la solución del polímero que se quiere realizar. Para favorecer este proceso, la solución se mantuvo con agitación magnética durante toda la noche. Una vez que el CHI

estuvo completamente disuelto, se ajustó el pH de la solución a 4,9 con una solución de NaOH 1 M, para favorecer la protonación de los grupos aminos del CHI. Luego se filtró la solución con una membrana de tamaño de poro de 0,45 μm para remover los residuos de las partículas insolubles. La solución de TPP se preparó en agua Milli Q y se filtró con una membrana con el mismo tamaño de poro, que el mencionado anteriormente.

La síntesis de las NPs de CHI se llevó a cabo colocando 10 mL de CHI (pH 4,9), precalentado a 60 °C, en un vaso de precipitados con fuerte agitación magnética, a la cual se le agregaron rápidamente, 3 mL de una solución de TPP en agua a 4 °C. La reacción transcurrió durante 10 min a temperatura ambiente (Fan y col., 2012).

Un esquema de la síntesis realizada se presenta en la figura 3.4.

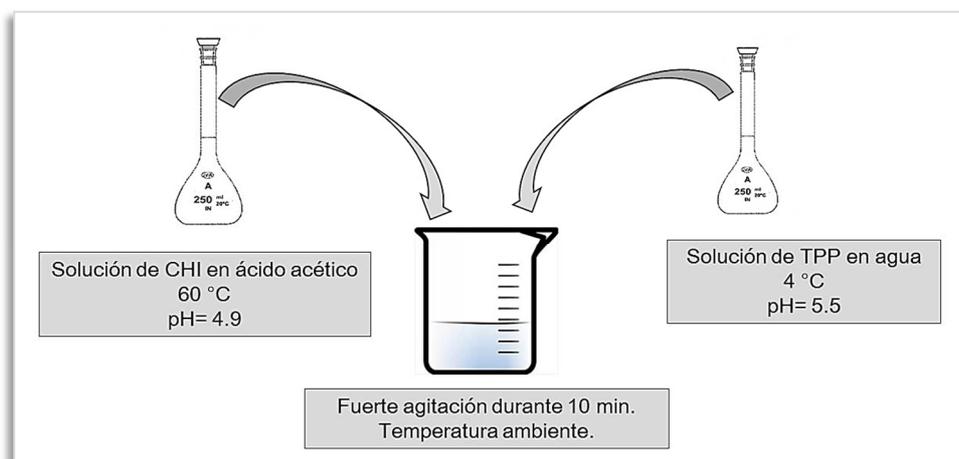


Figura 3.4: Esquema de la síntesis utilizada para la obtención de NPs.

Se determinaron las condiciones óptimas para la obtención de las NPs con tamaño menor a 500 nm, realizando diversas síntesis en donde se combinaron distintas concentraciones de CHI y TPP. Para este propósito, se prepararon soluciones de TPP en agua y de CHI en ácido acético a pH 4,9, a diferentes concentraciones, 0,25; 0,5; 0,75 y 1 mg/mL. La síntesis de las NPs se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente en esta sección.

Las suspensiones obtenidas se evaluaron en primera medida visualmente, clasificándolas en tres clases, según su apariencia (Calvo y col., 1997).:

- Soluciones claras: ausencia de NPs.
- Soluciones opalescentes: pequeñas partículas.
- Soluciones con separación de fases: formación de agregados

Posteriormente, se midió el tamaño de las partículas presentes en las muestras por DLS. De esta manera, se pudo establecer una relación entre la apariencia de las muestras obtenidas y el tamaño de partículas allí presentes.

3.1.2.2 Inclusión del Complejo HCT/ β CD en las NPs

Una vez que se seleccionaron las condiciones óptimas para la obtención de las NPs, éstas se sintetizaron conjuntamente con el complejo HCT/ β CD. Con este procedimiento se pretendió incorporar el complejo de HCT/ β CD en las NPs. Se trabajó con el complejo de la HCT y no con el fármaco solo, debido a que de esta manera se solubiliza mayor cantidad de principio activo.

El complejo HCT/ β CD se disolvió en la solución de TPP, ya que ésta se prepara en agua y a temperatura ambiente, posteriormente se enfría a 4 °C. La concentración del complejo en la solución de TPP fue de 1,44 mg/mL, equivalente a una concentración de HCT de 0,22 mg/mL. La síntesis de las NPs se realizó según el procedimiento descrito anteriormente en la sección 3.1.2.1.

El contenido de cada vaso de precipitado se colocó en tubos tipo Falcon, con una base de glicerol (aproximadamente 10 μ L), para ultracentrifugarlos a 13000 rpm, por 40 min, a 20 °C. Este procedimiento se realizó para aislar las NPs del exceso de principio activo y así obtener el *pellet* de NPs cargadas con el complejo HCT/ β CD. Se realizaron 3 ciclos de lavados, con el agregado de 7 ml de agua en cada uno. El glicerol se utilizó con el fin de evitar la agregación de las NPs centrifugadas (Rampino y col., 2013).

Se calculó la cantidad de fármaco encapsulado, utilizando un método indirecto que consistió en restar la cantidad de fármaco presente en el sobrenadante luego de aislar las NPs, a la cantidad inicial de principio activo

agregado¹. El porcentaje de fármaco encapsulado en las NPs, se obtuvo de acuerdo a la ecuación 3.1 (Krauland y col., 2007):

$$mg \text{ Fármaco}_{\text{encapsulado}} = mg \text{ Fármaco}_{\text{inicial}} - mg \text{ Fármaco}_{\text{sobrenadante}} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

La cuantificación de la HCT incorporada en las NPs, se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-Vis, a una longitud de onda (λ) de 270 nm. La curva de calibrado se realizó en agua, en un rango de $(1,2 - 6) \times 10^{-5}$ M.

3.1.2.3 Determinación de Tamaño y Potencial Z

El tamaño y el valor de potencial Z de las NPs se determinó utilizando la técnica de DLS.

La determinación del tamaño y del índice de polidispersidad (PDI), asociado a la muestra, se realizó colocando la suspensión de las NPs, debidamente diluida, en una celda de vidrio e indicando las condiciones de solvente e índice de difracción correspondiente en el software del equipo, Beckman Coulter Inc. Cada muestra fue medida 35 veces, por triplicado. La determinación del potencial Z se llevó a cabo bajo las mismas condiciones experimentales, colocando la muestra en una celda de electroforesis capilar, realizando 70 mediciones, por triplicado.

El tamaño promedio (nm), el índice de polidispersidad y el valor de potencial Z (mV) se calcularon utilizando la función de correlación CONTIN que provee el software del equipo.

¹ Si bien se trabaja con el complejo HCT/ β CD, éste complejo es inestable, por lo tanto, lo que se cuantifica en todos los casos es la HCT. El complejo fue ampliamente descrito y caracterizado en el capítulo 2 de este trabajo de tesis.

3.1.2.4 Estudios de Estabilidad

Los estudios de estabilidad se realizaron con el objetivo de determinar si las NPs sufren algún cambio a nivel macroscópico y/o nanométrico, cuando son sometidas a ambientes con diferentes valores de pH, en distintos períodos de tiempo.

El análisis a nivel macroscópico se realizó observando cambios en las soluciones, en relación a su aspecto general, separación de fases, etc. En cuanto al nivel nanométrico, se midió el tamaño y el PDI de las NPs por DLS.

Estos estudios se llevaron a cabo resuspendiendo el *pellet* de NPs, ya sean vacías o cargadas con el complejo HCT/ β CD, en soluciones tamponadas de HCl o fosfatos, según corresponda a los diferentes valores de pH (1,2; 5,5; 6,8; 7,4) y agua. Las suspensiones se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 días, simulando de esta manera las condiciones de almacenamiento.

Se consideró que las muestras son estables, cuando no se observan cambios significativos en cuanto a su apariencia y/o tamaño medido.

3.1.2.5 Microscopía Electrónica de Barrido

La técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM), fue utilizada con el objetivo de analizar la morfología, la superficie y la dispersión de tamaños de las NPs sintetizadas. También se utilizó un SEM, acoplado a espectroscopia de rayos X (EDX), para analizar los componentes químicos presentes en la superficie de las NPs sintetizadas. Esta técnica corroboró la presencia de HCT en las NPs, ya que se pudieron identificar átomos característicos del principio activo.

En ambos casos las muestras se prepararon de la misma manera. Los *pellets* se resuspendieron en agua y una gota de cada una de estas suspensiones se colocó sobre un soporte para SEM. La muestra se secó en una cámara de vacío y luego se metalizó con oro para poder analizarla por SEM.

3.1.2.6 Estudios de Liberación *in vitro*

Los estudios de liberación *in vitro* fueron realizados utilizando la técnica de diálisis en tubos con una membrana de celulosa (Joshi y col., 2010). En la figura 3.5 se presenta un esquema del dispositivo de trabajo empleado.

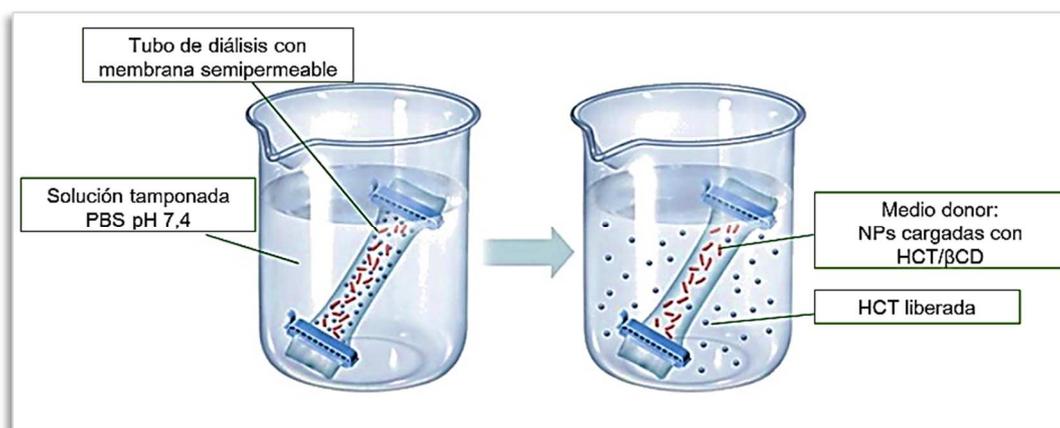


Figura 3.5: Esquema de la diálisis en tubos de membrana de celulosa.

Los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, en una solución tamponada de fosfatos (PBS) de pH 7,4. En los ensayos, el medio donador fue igual al medio receptor, utilizándose la misma solución tamponada.

Los ensayos se realizaron con *pellets* de NPs cargadas con el complejo HCT/βCD, con HCT sola y con el complejo solo, éstos dos últimos, como referencia para corroborar que el principio activo es capaz de atravesar la membrana. Tanto la suspensión de NPs, como las soluciones de HCT y el complejo, se prepararon con 5 mL de medio donador y se colocaron dentro del saco de membrana de celulosa sellado herméticamente (compartimento donador). La membrana se hidrató con medio donador durante 2 h, previo al comienzo del ensayo. Finalmente, la bolsa de diálisis se sumergió en 200 ml de medio receptor y se mantuvo con agitación constante, a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de 3 mL cada una con reposición de medio fresco, a intervalos de tiempos determinados por 24 h. La cantidad de HCT liberada, presente en las muestras se cuantificó utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a una $\lambda = 270$ nm. Cada ensayo se realizó por triplicado.

3.1.3 Resultados

3.1.3.1 Obtención de las Nanopartículas

Se realizó la síntesis de las NPs poliméricas aplicando la técnica de gelación iónica, combinando diferentes concentraciones de CHI y de TPP, para estudiar distintas relaciones molares de los componentes puros y obtener las mejores condiciones de trabajo.

Las muestras obtenidas se clasificaron, según su apariencia, en 3 categorías, opalescentes (formación de NPs), claras (ausencia de NPs) o separación de fases (formación de agregados). Dichos resultados se presentan en la figura 3.6, destacándose la condición seleccionada para los estudios posteriores.

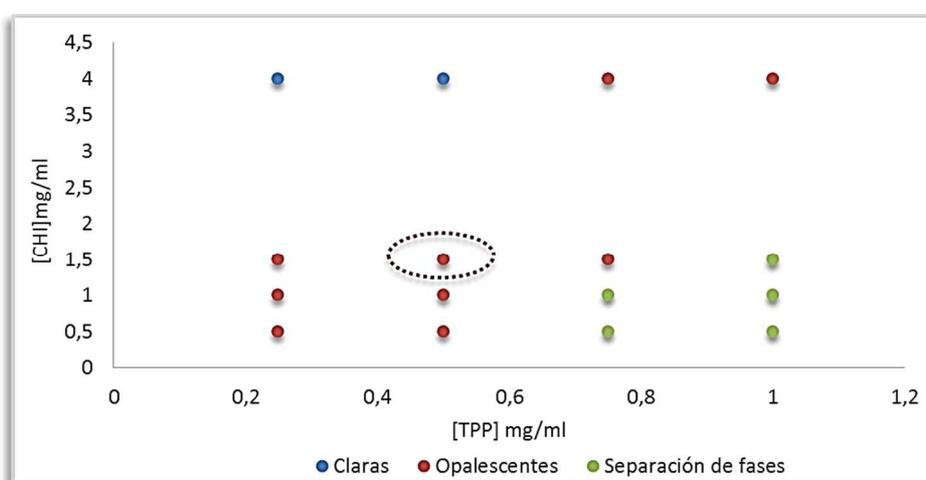


Figura 3.6: Evaluación visual de las NPs obtenidas a partir de la combinación de diferentes concentraciones de CHI y TPP, [CHI] mg/ml vs [TPP] mg/ml.

En base a los resultados presentados en el gráfico de la figura 3.6, se sugiere que la formación de NPs solo es posible en algunas condiciones específicas de concentración de CHI y TPP. El tamaño de las NPs sintetizadas depende de las concentraciones empleadas de los componentes puros.

Analizando los valores de los tamaños de las partículas obtenidas, se seleccionó la concentración de 2 mg/mL, tanto para el CHI como para el TPP, cuyas concentraciones finales, durante la síntesis de las NPs, son de 1,5 mg/mL y 0,5 mg/mL, respectivamente, con una relación molar final de CHI:TPP de 3:1. En estas condiciones se obtuvieron NPs con un tamaño de partícula óptimo y bajo PDI. Los resultados se presentan en la tabla 3.1 y se destaca la condición seleccionada para continuar con los estudios.

Tabla 3.1: Clasificación visual y tamaño de partícula con el PDI obtenido. Se destaca la condición seleccionada para continuar con los estudios.

| TPP | | CHI | | | | | | | |
|------------|--|--------------------------|-------|--------------------------|-------|---------------------------------|--------------|--------------------------|-------|
| | | 0,5 mg/mL | | 1 mg/mL | | 1,5 mg/mL | | 4 mg/mL | |
| | | Tamaño | PDI | Tamaño | PDI | Tamaño | PDI | Tamaño | PDI |
| 0,25 mg/mL | | <i>Sol. Opalescentes</i> | | <i>Sol. opalescentes</i> | | <i>Sol. opalescentes</i> | | <i>Sol. claras</i> | |
| | | 242 | 0,377 | 326 | 0,320 | 417 | 0,382 | No hay NPs | |
| 0,5 mg/mL | | <i>Sol. Opalescentes</i> | | <i>Sol. opalescentes</i> | | <i>Sol. opalescentes</i> | | <i>Sol. claras</i> | |
| | | 328 | 0,264 | 317 | 0,294 | 255 | 0,208 | No hay NPs | |
| 0,75 mg/mL | | <i>Separac. de fases</i> | | <i>Separac. de fases</i> | | <i>Sol. opalescentes</i> | | <i>Separac. de fases</i> | |
| | | Agregados | | Agregados | | 573 | 0,541 | Agregados | |
| 1 mg/mL | | <i>Separac. de fases</i> | | <i>Separac. de fases</i> | | <i>Separac. de fases</i> | | <i>Sol. Opalescentes</i> | |
| | | Agregados | | Agregados | | Agregados | | 665 | 0,285 |

3.1.3.2 Eficiencia de Encapsulación

Si bien se trabajó con el complejo HCT/ β CD, se menciona la cuantificación de la HCT, debido a que el complejo formado es dinámico e inestable (Onnainty y col., 2013); además, la β CD no tiene absorción en el espectro UV-Vis.

La curva de calibrado obtenida mantuvo la linealidad en todo el rango estudiado. El gráfico de la curva de calibrado y la ecuación de la recta obtenida, como resultado de la regresión lineal, se presenta en la figura 3.7.

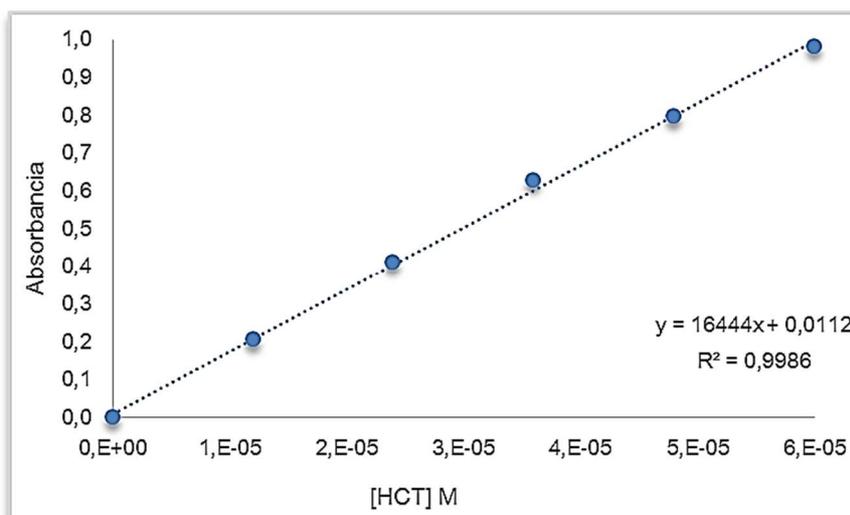


Figura 3.7: Curva de calibrado de HCT en agua, Abs vs [HCT] M.

Se cuantificó la HCT presente en los sobrenadantes luego de la centrifugación. La cantidad de HCT acomplejada con β CD, que se encapsuló en las NPs, se calculó aplicando la ecuación 3.1. Se concluyó que por cada *pellet* obtenido de NPs, había aproximadamente $(0,4 \pm 0,1)$ mg de principio activo.

3.1.3.3 Determinación del Tamaño y Potencial Z

Se determinó el tamaño y el potencial Z utilizando la técnica de DLS.

La técnica de DLS, también conocida como espectroscopía de correlación de fotones (PCS) o dispersión de la luz cuasi-elástica (QELS), toma la variación de la intensidad de la luz difractada en una escala de tiempo de microsegundos. Esta variación resulta de la interferencia de la luz refractada de partículas individuales bajo la influencia del movimiento Browniano, y es cuantificado por la recopilación en función de autocorrelación. Esta función tiene un ajuste exponencial, o alguna combinación o modificación de la misma, con la constante de desintegración correspondiente, estando relacionados con el coeficiente de difusión. Asumiendo que las NPs tienen forma esférica, baja concentración y se conoce la viscosidad del medio en el que están suspendidas, el tamaño de partícula se calcula desde ese coeficiente (Grupta RB, 2006).

El PDI es un parámetro obtenido de manera simultánea con el tamaño de la partícula. Este índice refleja la distribución de tamaños de la población de nanopartículas: valores cercanos a 0 indican que la muestra es mono dispersa, así como valores mayores a 0,5 indican que la muestra presenta distintas poblaciones de tamaños (Lancheros y col., 2014).

Si bien el tamaño de la partícula se considera uno de los parámetros más importantes, la carga superficial no es un detalle menor. Este factor relevante determina la interacción entre partículas y las características que tendrá la dispersión, tales como la estabilidad, la floculación, la viscosidad, la formación de films, etc. Las cargas superficiales no pueden medirse directamente, lo que sí puede determinarse es la carga a una cierta distancia de la partícula, llamado medición del potencial Z. Este valor de potencial Z es usualmente de gran interés porque las partículas interactúan según su valor (Grupta RB, 2006). Para que un sistema sea estable, ese valor debe ser mayor a 30 mV (en valor absoluto), lo cual indica que las NPs tienen cargas superficiales lo suficientemente grandes como para repelerse unas a otras, evitando de esta manera el colapso del sistema.

El DLS es un equipo muy utilizado ya que tiene grandes ventajas, como la velocidad de análisis, no requiere calibración y tiene buena sensibilidad a las partículas nanométricas.

Las muestras se irradiaron con un haz láser de He-Ne 633 nm, la dispersión de la luz se recolectó a un ángulo de barrido de 165° a temperatura ambiente, con la cual se realizaron las mediciones de los tamaños.

Una vez optimizado el proceso de síntesis y de centrifugado de las muestras, el tamaño promedio de las NPs obtenidas fue de 220 nm, lo cual indicó que el procedimiento empleado fue reproducible. La presencia del complejo en las NPs, modificó el tamaño de las mismas, siendo en este caso aproximadamente de 390 nm, indicando la incorporación de otros componentes al sistema. El PDI, en todos los casos, fue menor a 0,25, lo cual indicó que la distribución de tamaño corresponde a la presencia de una sola población. El potencial Z medido fue positivo, lo cual fue consistente con la carga neta del CHI y con un valor promedio de 30 mV. Este dato es muy útil ya que supone un sistema estable y que no

colapsaría espontáneamente. Esto se corroboró con los estudios de estabilidad realizados.

Los resultados obtenidos se informan en la tabla 3.2 y en la figura 3.8 se muestran las curvas características de distribución de tamaño según la intensidad, de cada una de las muestras.

Tabla 3.2: Tamaños, PDI y potencial Z de las NPs.

| | Tamaño | PDI | Potencial Z |
|-------------------------|--------|-------|-------------|
| NPs Vacías | 223 nm | 0,253 | 49 mV |
| NPs con Complejo | 390 nm | 0,191 | 33 mV |

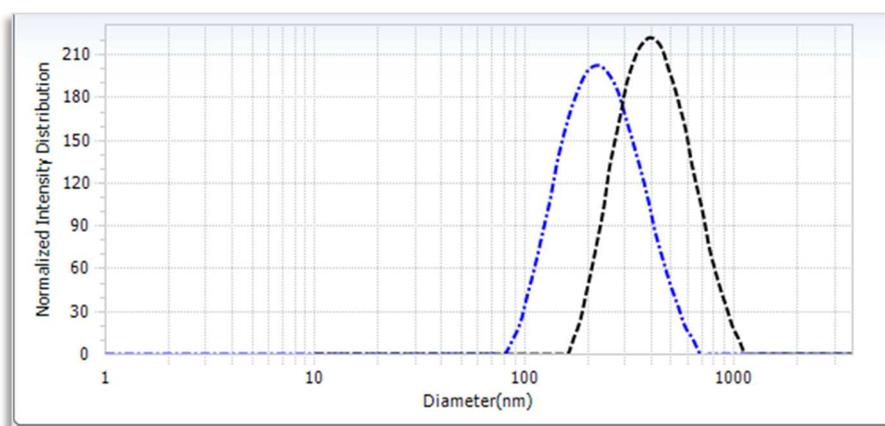


Figura 3.8: Distribución de tamaño. Azul, NP vacías. Negro, NPs/complejo.

3.1.3.4 Estudios de Estabilidad

La estabilidad del sistema fue evaluado teniendo en cuenta la variación del tamaño y el PDI de las NPs, en un período de tiempo determinado. Estos estudios se llevaron a cabo resuspendiendo los *pellets* de las NPs cargadas con el complejo de inclusión HCT/ β CD en soluciones tamponadas de diferentes valores de pH y en agua, como control.

A nivel macroscópico, ninguna muestra tuvo cambios significativos en su apariencia, por lo cual, todas las muestras se analizaron por DLS para corroborar el tamaño de las partículas allí presentes.

Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente por 20 días, simulando condiciones de almacenamiento. En los días 1, 7, 14 y 20 se midieron los tamaños y el PDI de las NPs presentes en la suspensión.

Se observó que las muestras almacenadas en agua y en soluciones tamponadas, con valores de pH de 1,2 y 5,5, no presentaron cambios significativos en el tamaño ni en el valor del PDI. Mientras que, en las muestras que se resuspendieron en soluciones tamponadas de valores de pH de 6,8 y 7,4 se demostraron cambios significativos en cuanto a su tamaño y PDI. A pH 6,8, se observó un aumento de tamaño con el tiempo; mientras que a pH 7,4 se formaron agregados inmediatamente y se mantuvieron a lo largo del estudio, con un tamaño máximo de aproximadamente 4 μm . En ambos casos los valores de PDI fueron muy grandes, debido a la polidispersidad de la muestra. Sin embargo, en ningún caso se observó la separación de fases del sistema. Tanto las NPs vacías, como cargadas con el complejo de inclusión, mostraron el mismo comportamiento.

Los resultados se presentan en la figura 3.9, en donde se compararon los tamaños de las NPs cargadas, de las diferentes muestras, según transcurren los días en los distintos medios. Cabe destacar que sólo se ha graficado hasta 700 nm para destacar las diferencias en los tamaños (nm) de todas las muestras. A pH 7,4 los agregados tuvieron un tamaño mayor a los 4000 nm.

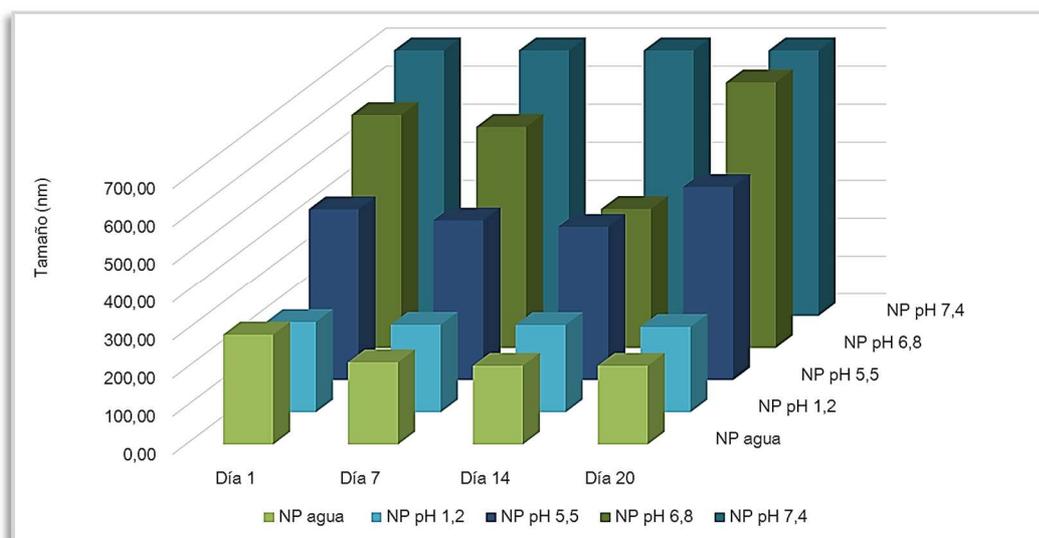


Figura 3.9: Estabilidad de las NPs cargadas en diferentes medios durante 20 días.

3.1.3.5 Microscopía Electrónica de Barrido

El fundamento del SEM radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que se ha hecho un alto vacío. En ella, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas, es decir, que su diámetro va disminuyendo hasta hacerse casi puntual. El haz electrónico puntual se desplaza sobre toda la superficie de la muestra a modo de un pincel que barre la muestra continuamente. Esta movilidad del haz se consigue gracias a un sistema de bobinas de barrido situadas en la columna del instrumento.

En la interacción del haz electrónico con la superficie se producen electrones secundarios que, tras ser captados por un detector, se hacen incidir sobre un “scintillator”, donde cada electrón dará origen a varios fotones. Dichos fotones son dirigidos hasta un fotomultiplicador a través de una serie de diodos con diferencias de potencial crecientes y se produce, mediante un efecto en cascada, una gran cantidad de electrones secundarios. Lo que se consigue es una amplificación de la corriente debido a los electrones secundarios originales o, dicho de otro modo, una amplificación de la información sobre la muestra suministrada de dichos electrones. Los electrones secundarios, finalmente,

previo paso por un video-amplificador, son dirigidos hacia un tubo semejante a un osciloscopio de rayos catódicos sobre cuya pantalla se produce la imagen.

En resumen, una de las principales características de este instrumento es la existencia de una correspondencia punto a punto establecida entre la muestra a examinar y la imagen formada. Esta correspondencia se establece al mismo tiempo, de forma que cubre la muestra en series de tiempo, quedando la imagen dividida en muchos elementos fotográficos, los cuales son captados por el sistema instalado en el instrumento e integrados a una sola imagen que informa sobre la apariencia cúbica del material en estudio (Renau-Piqueras y col., 1965).

Se obtuvieron imágenes muy claras de las NPs por SEM, en donde se pudo observar que las NPs eran de morfología esférica y con la superficie lisa. Se evidenció la presencia de NPs de diferentes tamaños, lo cual coincidió con el valor de PDI obtenido previamente por DLS, lo cual indicaba que las muestras estaban compuestas por partículas en un rango de tamaños. Para hacer este análisis, se utilizaron las imágenes de aquellas NPs más grandes ya que las pequeñas forman aglomerados, debido a la técnica utilizada para la preparación de la muestra. En la figura 3.10, se presentan algunas de las imágenes obtenidas, en donde se puede apreciar lo anteriormente descrito.

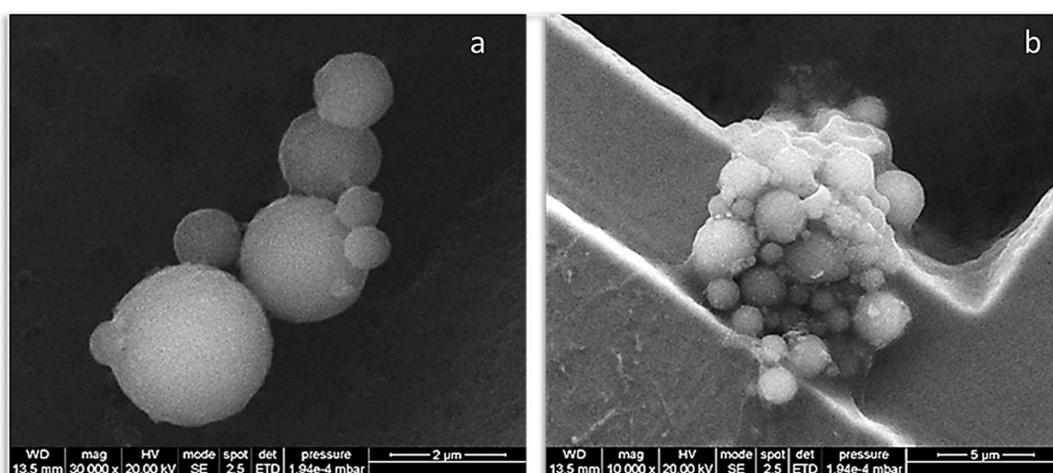


Figura 3.10: Fotografías SEM de NPs vacías. a) Escala 2 μm, 30000x.

b) Escala 5 μm, 10000x.

Por su parte, la microscopía electrónica de barrido, acoplada con espectroscopía de rayos X de energía dispersa (SEM/EDX), es una técnica muy poderosa, aplicada a microimágenes de una gran variedad de superficies. Esta técnica se puede usar para explorar la estructura y la textura de la superficie, para obtener un mapa detallado de la distribución de elementos de materiales multifase o complejos (Azizi, 2015).

El objetivo de este estudio fue identificar, en la superficie de las NPs, la presencia de átomos característicos del principio activo.

Por medio de esta técnica, se evidenció la presencia de átomos de azufre (S) en la superficie de las NPs lo cual fue debido, pura y exclusivamente, a la presencia de HCT en el sistema. Como blanco, se realizó este mismo análisis a un lote de NPs vacías y se observó la ausencia de dicho elemento. Por lo tanto, se pudo confirmar que las NPs contenían HCT.

En la figura 3.11 se presenta el gráfico obtenido del software del equipo de SEM, en donde se pudo observar la presencia de azufre en la muestra analizada.

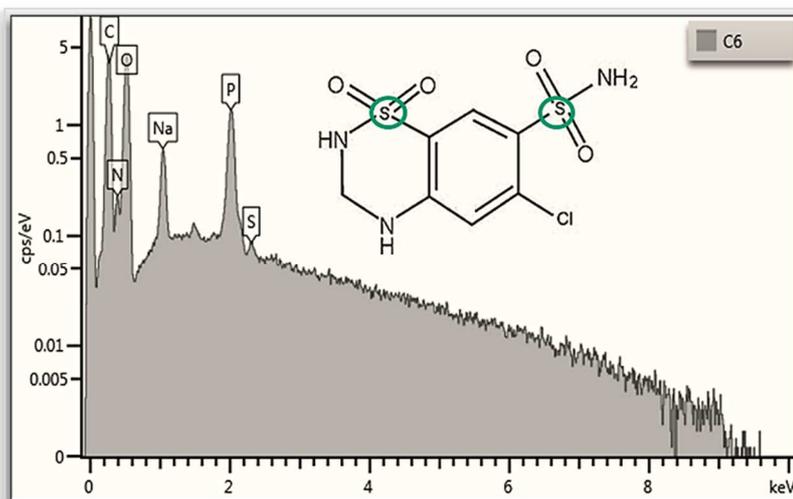


Figura 3.11: Gráfico de EDX acoplado a SEM para la determinación de los elementos presentes en NPs cargadas con el complejo HCT/βCD.

3.1.3.6 Estudios de Liberación *in vitro*

Los estudios de liberación *in vitro*, se realizaron con muestras de HCT, HCT/ β CD y un *pellet* de NPs cargadas con el complejo, empleando la técnica de diálisis en tubos con una membrana de celulosa. Estos ensayos demostraron que la HCT, ya sea sola o acompañada con β CD, pudo atravesar la membrana del compartimento donador, ya que se cuantificó fármaco en el compartimento receptor. Se observó que a las 24 h se liberó el 100% de la HCT, que estaba en solución y, un 85% de la HCT que se encontraba acompañada con β CD. En los perfiles de liberación que se presentan en la figura 3.12, solo están graficados los datos obtenidos durante las primeras 8 h.

En los ensayos realizados con muestras de NPs cargadas con el complejo, no se pudo cuantificar la HCT en el compartimento receptor, lo cual indicó que la HCT no se liberó del sistema nanoparticulado durante el tiempo que se realizó el estudio.

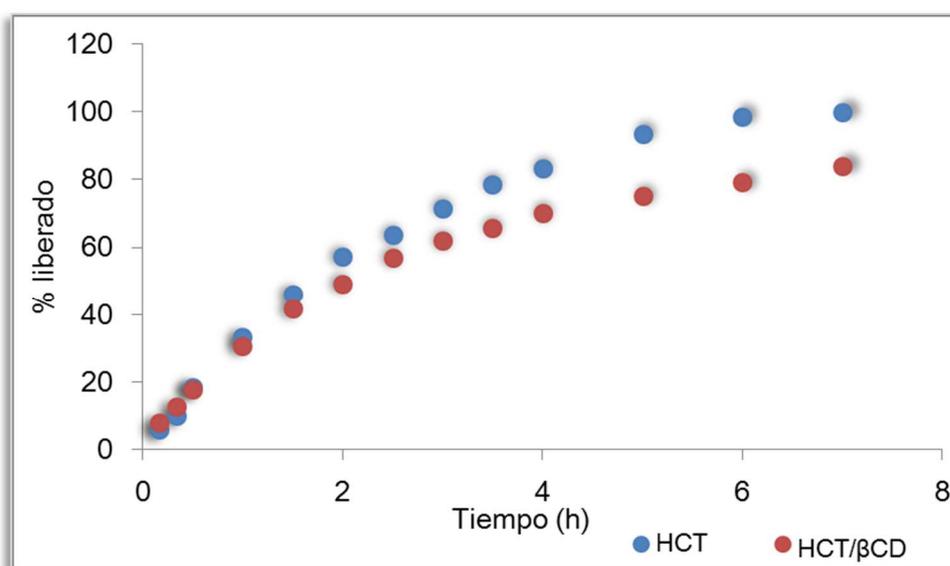


Figura 3.12: Perfil de liberación en PBS pH 7,4.
%Fco liberado vs tiempo (h).

3.1.4 Discusión

Se sintetizaron NPs poliméricas combinando CHI y TPP, utilizando la técnica de la gelación iónica. Estas NPs se cargaron con el complejo de inclusión HCT/ β CD, de manera eficiente. La cantidad de HCT en su forma de complejo encapsulado en cada *pellet*, fue de 0,4 mg. Las NPs cargadas evidenciaron un aumento en el tamaño con respecto a las NPs vacías, encontrándose tamaños de 390 nm y 223 nm, respectivamente. La presencia del principio activo en el sistema nanoparticulado se demostró utilizando la técnica de SEM acoplado a EDX. La morfología de las NPs obtenidas se analizó utilizando la técnica de SEM.

Los estudios de estabilidad demostraron que el sistema fue estable en soluciones tamponadas de pH menor a 6 y en agua; ya que en estas condiciones no se observaron cambios en el tamaño ni en el PDI. Por el contrario, a valores de pH mayores de 6 el sistema tuvo un comportamiento inestable, si bien no se observó una separación de fases debido a una floculación espontánea, por DLS se evidenció la presencia de grandes agregados.

Sin embargo, esta inestabilidad no influyó en la liberación del fármaco. Los resultados de los estudios de liberación *in vitro*, utilizando la técnica de diálisis en tubos de membrana de celulosa, indicaron que no hubo liberación de la HCT desde las NPs. Se postula que la liberación del fármaco desde el sistema nanoparticulado depende de la erosión de las NPs producida por enzimas presentes en el intestino.

Para tener como referencia si el fármaco podía atravesar la membrana que se estaba utilizando en estos ensayos *in vitro*, se realizaron estos estudios de liberación, en las mismas condiciones experimentales, con HCT y con el complejo HCT/ β CD. Estos ensayos demostraron que el fármaco libre es capaz de atravesar completamente la membrana (100%) y que la cinética de liberación del principio activo desde el complejo de inclusión es rápida, ya que se cuantificó más del 85% de HCT en el medio receptor.

3.1.5 Conclusiones Parciales

Se obtuvieron NPs poliméricas de CHI y TPP utilizando la técnica de gelación iónica. Experimentalmente se determinó que las condiciones óptimas para la obtención de NPs, fue una relación molar CHI/TPP de 3:1; obteniendo así NPs con un tamaño adecuado para la encapsulación del complejo HCT/ β CD, con un bajo PDI y con un alto valor de potencial Z positivo.

Los estudios de estabilidad de las NPs, se realizaron a temperatura ambiente, por 20 días. Éstas demostraron ser estables en soluciones tamponadas de pH menor a 6 y en agua, e inestables en soluciones reguladoras de valores de pH mayores a 6, observándose en esos casos, la formación de agregados, pero no la floculación espontánea del sistema.

El análisis de las imágenes obtenidas por SEM indicaron que las NPs obtenidas son esféricas y de superficie lisa. También se evidenció la presencia de diferentes tamaños de partículas, como se esperaba debido a que el PDI fue aproximadamente 0,25. Los resultados EDX demostraron la presencia de azufre debido a la HCT en las muestras de NPs cargadas.

Los ensayos de liberación *in vitro*, que se realizaron empleando soluciones tamponadas de diferentes valores de pH, demostraron que el principio activo no se libera del sistema nanoparticulado.

En conclusión, las NPs poliméricas sintetizadas fueron ampliamente caracterizadas fisicoquímicamente, permitiendo continuar con estudios biofarmacéuticos del sistema.

PARTE II: ESTUDIOS BIOFARMACÉUTICOS

3.2.1 Instrumental

Las muestras se pesaron en una balanza analítica Voyager Ohaus modelo Explorer E01140 y se solubilizaron con la ayuda de un ultrasonicador Elma S 40 Elmasonic.

El pH se determinó utilizando un pH-metro Hanna instrument HI 255 combined meter.

Las cuantificaciones del fármaco se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis, empleando celdas de cuarzo de 1cm de paso óptico Hellma Analytics; y un equipo de cromatografía líquida de alta resolución, JASCO.

El procedimiento de extracción en fase sólida se realizó utilizando cartuchos de extracción Strata-X 30 mg, Phenomenex® y celda de vacío Phenomenex®. Las muestras se concentraron utilizando un concentrador Techne Sample Concentrator, Dri-Block® DB-3A.

En el centro de Microscopía de la UNC se realizaron los estudios histológicos utilizando un Microscopio Óptico Zeiss Axiostar Plus, equipado con una cámara digital AxioCam ERc 5s, y los estudios de ultra estructura se llevaron a cabo con un microscopio electrónico Zeiss LEO 906E. Los cortes semifinos y finos de las muestras, se realizaron con un ultramicrotomo JEOL JUM-7 con cuchilla de diamante.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Estudios de Mucoadhesión

Para evaluar las propiedades mucoadhesivas del sistema nanoparticulado obtenido, se emplearon dos técnicas, ambas consistieron en poner en contacto las NPs cargadas con el complejo HCT/ β CD, con una solución de mucina gástrica porcina. Las técnicas se describen a continuación.

3.2.2.1.1 Determinación por Potencial Z

Este estudio de mucoadhesión es un método *in vitro* conocido como la técnica de la mucina (Sriamornsak y col., 2010), para lo cual se utiliza mucina gástrica porcina (MUC).

Esta técnica consistió en preparar una suspensión de MUC, de concentración 0,4 mg/mL, en una solución tamponada de fosfatos de pH 7,4. Se colocaron 2 mL de la suspensión de MUC junto a 2 mL de una suspensión de NPs cargadas con el complejo HCT/ β CD, preparada en la misma solución tamponada. Las muestras se mantuvieron con agitación magnética constante durante 24 h y a temperatura ambiente, para alcanzar el equilibrio entre ambos sistemas.

La mucoadhesión del sistema, se determinó midiendo el potencial Z de las NPs resuspendidas en la solución tamponada y del sistema MUC:NPs estabilizado.

El valor diferente de potencial Z de la superficie de las NPs, es un indicador de que ocurre una interacción electrostática entre las cargas positivas de las NPs y las cargas negativas de la mucina.

3.2.2.1.2 Determinación por SEM

Este estudio de mucoadhesión se basó en detectar cambios en la estructura de la mucina a nivel microscópico, cuando ésta es puesta en contacto con un

sistema mucoadhesivo, como son las NPs de CHI. Para llevar a cabo este estudio, se tomó 1 mL de una suspensión de mucina de concentración 1 mg/mL en una solución tamponada de fosfatos de pH 7,4 y se la puso en contacto con un *pellet* de NPs cargadas con el complejo HCT/ β CD, resuspendido previamente en 3 mL de la misma solución tamponada. Se dejó equilibrar esta mezcla (MUC:NPs) por 24 h, con agitación magnética constante y a temperatura ambiente.

Se analizaron muestras de la suspensión de MUC, utilizada como control y de la suspensión MUC:NPs. Las muestras se acondicionaron para analizarlas por SEM, como se describió previamente en la sección 3.1.2.5. Cambios estructurales en la microestructura de la MUC es indicio de que existen interacciones entre ambos componentes.

3.2.2.2 Estudios de Permeabilidad Intestinal *in vitro*

Para determinar el comportamiento biofarmacéutico de las NPs cargadas con el complejo HCT/ β CD, se realizaron estudios de permeabilidad *in vitro*, utilizando la técnica *ex vivo*, de saco intestinal evertido de ratas. Dichos experimentos se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Mario Alfredo Quevedo, investigador de UNITEFA-CONICET, en el departamento de Farmacia, de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

Los estudios se llevaron a cabo con ratas Wistar machos de 3 meses de edad (500 – 600 g). Los animales se anestesiaron mediante la administración intraperitoneal de una solución de uretano (1000 mg/Kg). Posteriormente, se les realizó una incisión de 2 cm en la línea de la cavidad abdominal, aislando un segmento de intestino de 10 cm del yeyuno proximal. Luego de la obtención del tejido, los animales se sacrificaron a través de la administración de dióxido de carbono, en una cámara previamente saturada con este gas. Cabe destacar que estos procedimientos fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC. (Res. Nº 138/07), para el uso de animales en protocolos experimentales.

El segmento de intestino extraído se colocó en medio de cultivo TC199 previamente disuelto en bicarbonato de sodio, con un pH final de 7,4 y burbujeo de gas carbónico, para mantener el tejido vivo.

El intestino se invirtió y se lavó exhaustivamente con medio de cultivo TC199 a 37 °C, ya que el mismo debe estar limpio para poder utilizarse en el ensayo. El segmento de intestino evertido se sumergió en 45 mL de medio de cultivo TC199 (*solución mucosal*), con burbujeo de gas carbónico y termostatzado a 37 °C. La muestra a permear se colocó en la solución mucosal y la fracción permeada que se tomó fue de 2 mL desde el interior del saco intestinal (*solución serosal*), con reposición de medio fresco (Quevedo y col., 2009). El esquema del dispositivo de trabajo se muestra en la figura 3.13.

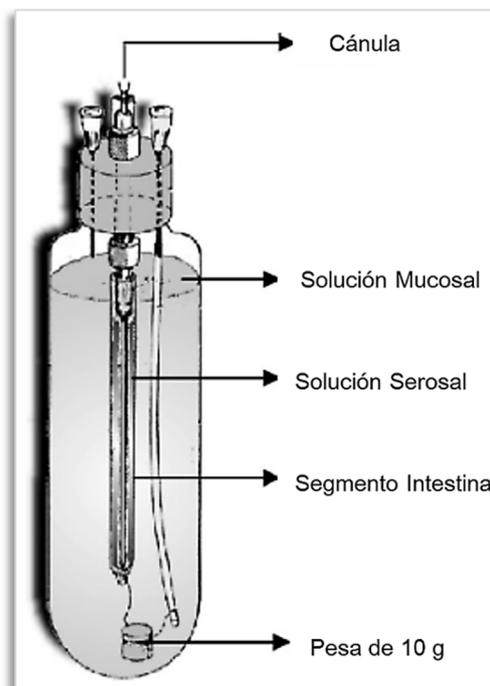


Figura 3.13: Dispositivo de trabajo utilizado en los estudios de permeabilidad.

3.2.2.3 Estudios de Viabilidad Intestinal

Los ensayos de viabilidad se realizaron en simultáneo a los estudios de permeabilidad, es decir, se tomaron 20 μ L de cada una de las muestras de 2 ml extraídas de la solución serosal, cada 10 min durante 120 min.

Se cuantificó la glucosa presente en las muestras de 20 μL , utilizando un kit comercial (Wiener lab) para este fin. El protocolo de trabajo empleado consistió en incubar a 37 °C por 10 min, los 20 μL de la muestra con 2 mL de solución de trabajo, la cual estaba compuesta por el 50% de agua destilada, el 5% de 4-aminofenazona 25 mM en buffer TRIS (0,92 M), el 5% de una solución de fenol 55 mM y el 0,3% de glucosa oxidasa 1000 U/mL y peroxidasa 120 U/mL. La absorbancia correspondiente de la muestra se midió utilizando un espectrofotómetro UV-Vis, a una longitud de onda de 505 nm (Quevedo y col., 2011).

3.2.2.4 Técnica Bioanalítica

La cuantificación de HCT se realizó utilizando una columna C18 Restek de 15 cm x 4,5 mm x 5 μm , con precolumna C18 Phenomenex y aplicando las condiciones cromatográficas que se describen a continuación. La fase móvil utilizada fue H_2O acidificada con ácido acético, pH 3,6: metanol (MeOH) 80:20, durante los primeros 5 min, luego se aplicó un gradiente por 4 min hasta llegar a una composición final 50:50, manteniéndose constante por 2 min. El flujo fue de 1 mL/min, el volumen de inyección de 15 μL y la columna se mantuvo termostaticada a 35 °C. Se utilizó como estándar interno cafeína, en una concentración constante de $1,9 \times 10^{-5}$ M.

Las muestras biológicas se acondicionaron utilizando un procedimiento de extracción en fase sólida para ser cuantificadas por HPLC y se concentraron a sequedad. Posteriormente, las muestras, se resuspendieron en 200 μL de una solución de MeOH: H_2O 50:50 para su cuantificación por HPLC.

3.2.2.4.1 Extracción en Fase Sólida

La preparación de las muestras analíticas, para ser determinadas por HPLC, requirió de la extracción en fase sólida (EFS) de la HCT.

Este procedimiento de extracción involucró un paso previo de hidratación, con MeOH y de activación de los cartuchos, con una solución tamponada de fosfatos 100 mM pH 2, antes de comenzar a utilizarlos. Luego, se colocaron las muestras tomadas de la solución serosal en los cartuchos. Se utilizó una solución de H₂O:MeOH 90:10 como solvente de lavado. Los cartuchos se secaron realizando vacío y luego, la HCT se eluyó con acetonitrilo (ACN), siendo posteriormente evaporada a sequedad con nitrógeno (N₂) (Gualdesi y col., 2012). El procedimiento se esquematiza en la figura 3.14.

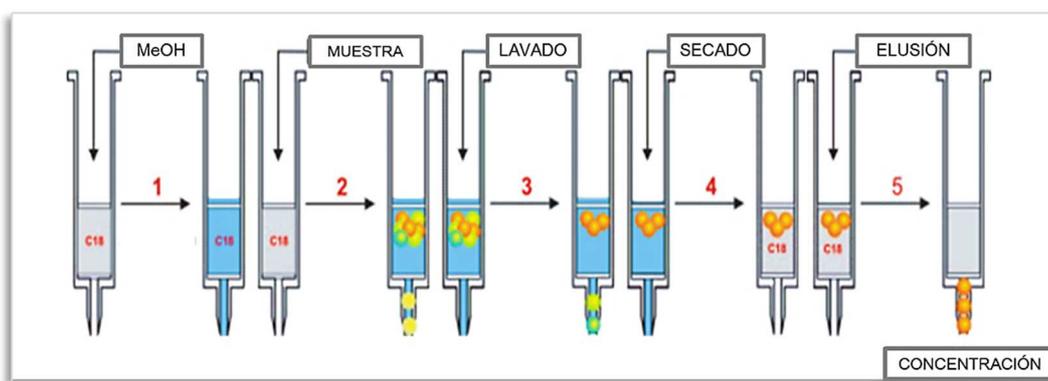


Figura 3.14: Esquema de extracción en fase sólida.

Se evaluó la recuperación, tanto del analito como del estándar interno (cafeína), antes de su aplicación en los ensayos bioanalíticos.

3.2.2.4.2 Validación de la Técnica Cromatográfica

La validación de la técnica se realizó utilizando las normas ICH (ICH, 2005) y la guía para la industria de la FDA (FDA, 2001).

Se realizaron las curvas de calibrado, en medio de cultivo TC199, por triplicado. Se trabajó en un rango de concentraciones de HCT de $1,7 \times 10^{-8}$ a $3,4 \times 10^{-6}$ M, manteniendo constante la concentración del estándar interno en $1,9 \times 10^{-5}$ M. Las muestras se acondicionaron utilizando el método de EFS, anteriormente descrito. En estas condiciones se evaluaron selectividad, linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud.

3.2.2.4.3 Estudios de Estabilidad

Se realizó un estudio de estabilidad en medio de cultivo TC199 (pH 7,4) reproduciendo las condiciones en las cuales se llevaron a cabo los estudios de permeabilidad. El ensayo se llevó a cabo resuspendiendo un *pellet* de NPs cargadas con el complejo HCT/ β CD en 10 mL de medio de cultivo TC199 y se la colocó en un baño termostatzado a 37 °C, durante 2 h.

Transcurrido el tiempo previsto, se tomaron muestras de las soluciones para corroborar por DLS, el tamaño y el PDI, de las NPs allí presentes.

3.2.2.5 Análisis de los Datos

Se obtuvieron los perfiles de permeabilidad de la HCT, desde las diferentes muestras, graficando los μ g de fármaco permeado en función del tiempo (min). De la porción lineal de los perfiles de permeabilidad obtenidos, se realizó el análisis de regresión lineal; del cual, de la pendiente, se obtuvo el valor del flujo (F, μ g/min). El coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app} , cm/min) se calculó aplicando las ecuaciones 3.2 y 3.3.

$$P_{app} = \frac{F}{Sup_{exp} \cdot C_i} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

$$Sup_{exp} = 2\pi r h \quad \text{Ecuación 3.3}$$

En donde, Sup_{exp} es la superficie del intestino disponible para la permeación, C_i es la concentración inicial del fármaco en la solución mucosal, r es el radio promedio del segmento intestinal (0,4 cm) y h es el largo del segmento intestinal disponible para la permeación (10 cm) (Quevedo y col., 2009).

3.2.2.6 Análisis Estadístico de los Datos

Los datos se analizaron estadísticamente realizando análisis de varianzas de un factor (ANOVA). El ANOVA sirve para comparar varios grupos en una

variable cuantitativa. Se trata por lo tanto, de una generalización de una prueba t para dos muestras independientes al caso de diseños con más de dos muestras. La hipótesis que se pone a prueba en el ANOVA es que las medias poblacionales son iguales. La estrategia para poner a prueba la hipótesis de igualdad de medias, consiste en obtener un estadístico, llamado f , que refleja el grado de parecido existente entre las medias que se están comparando. El valor de la distribución $f_{crítico}$ es conocido y está tabulado; si este estadístico de contraste supera cierto valor crítico, diremos que las diferencias son estadísticamente significativas.

3.2.2.7 Estudios de Toxicidad Intestinal

Una vez finalizados los ensayo de permeabilidad, realizados con 750 μg de HCT y con *pellets* de NPs cargadas con HCT/ β CD con una cantidad equivalente de HCT a $(0,4 \pm 0,1)$ mg; se cortó un pequeño segmento del intestino utilizado durante el experimento y se abrió longitudinalmente por el borde mesentérico. Los pedacitos de intestino se fijaron en una solución Karnovsky, compuesta por formaldehído al 4% y glutaraldehído a 1,5%, en solución tamponada de cacodilato 0,1 M de pH 7,4 durante un período mínimo de 2 h, a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se lavaron tres veces con solución tamponada de cacodilato y tratadas con tetróxido de osmio al 1% en la misma solución tamponada, a temperatura ambiente durante 1 – 2 h. El material fijado se lavó tres veces con una solución tamponada de acetato de pH 5,4; luego se le realizó una coloración en bloque con acetato de uranilo al 1% en la misma solución tamponada, por 20 min. Posteriormente, el material fue deshidratado con soluciones acuosas de acetona de graduaciones crecientes (50, 70 y 90%), durante 5 min en cada una de ellas, y el proceso se completó realizando tres pasajes, de 15 min cada uno, en acetona al 100%. La inclusión del tejido se realizó en una mezcla de resinas epóxicas compuestas de Araldita 506® (48,5%), anhídrido dodecenilsuccínico (DDSA) (48,5%), dibutilftalato (DBP) (0,5%), acelerador dimetilaminobenceno (BDMA) (2,5%). El procedimiento de inclusión se llevó a cabo infiltrando la muestra en una mezcla de partes iguales del medio de inclusión y acetona al 100% durante al menos 3 h, luego se realizó la pre-

inclusión en una mezcla completa de Araldita 506® a temperatura ambiente durante 6 – 8 h; finalmente, se realizó la inclusión final en Araldita 506® a 60 °C, durante 24 h.

Para el microscopio óptico, se cortaron secciones de 150 – 200 nm de espesor, con un ultramicrotomo de cuchilla de diamante, de manera seriada y se tiñeron con una solución de azul de toluidina y bórax al 1%. Los estudios ultraestructurales se llevaron a cabo con un microscopio electrónico, para lo cual las muestras se cortaron en secciones finas de 90 – 120 nm, también con un ultramicrotomo de cuchilla de diamante, teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Cabe destacar, que los estudios de toxicidad intestinal se realizaron en colaboración con la Dra. Alicia Torres y el Dr. Juan P. Pettiti, INICSA-CONICET, Centro de Microscopía Electrónica, UNC.

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Estudios de mucoadhesión

El mucus es una barrera viscosa, elástica y pegajosa que recubre todos los tejidos mucosos, protegiendo los epitelios del cuerpo humano, tales como los del TGI, la vagina, los pulmones, los ojos, entre otros. Su función es atrapar y remover rápidamente excipientes y sustancias extrañas al cuerpo humano (Grießinger y col., 2015).

El mucus está compuesto mayoritariamente por agua (95%), lípidos, sales inorgánicas y glicoproteínas llamadas mucina. La **mucina** consiste en grandes monómeros macromoleculares, con una proteína de cadena principal, con uno o más dominios altamente glicosilados, ricos en residuos de serina y treonina, los cuales sirven como puntos de anclaje para las cadenas laterales de los oligosacáridos. Las cadenas de los oligosacáridos tienen residuos de azúcar tales como galactosa, fructuosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico. A pH > 3, ambos, los ácidos siálicos y los carbohidratos sulfatados, están totalmente ionizados y esto le confiere a las moléculas de mucina una carga neta negativa. La mucina es la responsable de las propiedades

viscoelásticas del mucus. Debido a su relevancia para la mucoadhesión y adsorción, la mucina se ha estudiado en una gran variedad de superficies y aplicando diferentes técnicas. Comercialmente, se consigue la mucina gástrica porcina, la cual ha sido utilizada ampliamente en investigación (Oh y col., 2015). La mucina gástrica porcina se eligió como modelo para estos estudios de estructura y propiedades funcionales; se la denomina generalmente MUC.

3.2.3.1.1 Determinación por potencial Z

Las propiedades superficiales de los polímeros mucoadhesivos y de la mucina, que forma parte del mucus, pueden estudiarse en base a una teoría eléctrica. La suposición de esta teoría es que ambas superficies, la de la mucina y la de los polímeros, tienen diferentes cargas eléctricas. Cuando los polímeros entran en contacto con la superficie mucosal ocurre una transferencia de electrones, provocando la formación de una doble capa eléctrica en la interface polímero - mucina. Se cree que la fuerza mucoadhesiva se debe a las fuerzas de atracción de la doble capa eléctrica de dicha interface. El método más utilizado para estudiar la carga superficial de los polímeros es la determinación del potencial Z (Sriamornsak y col., 2010).

Se observó que el valor de potencial Z de las NPs cargadas fue cercano a +40 mV y el de la MUC sola fue de -22 mV. Al poner en contacto las suspensiones de estos dos compuestos, se observó que el valor de potencial Z de las NPs cargadas, disminuyó considerablemente a +18 mV.

Esta reducción en el valor del potencial Z se atribuyó a las interacciones del tipo electrostáticas que tienen lugar entre las cargas negativas de los residuos de ácido siálico presentes en la mucina y las cargas positivas de los grupos aminos del CHI. Dichos resultados se representan en el gráfico de la figura 3.15.

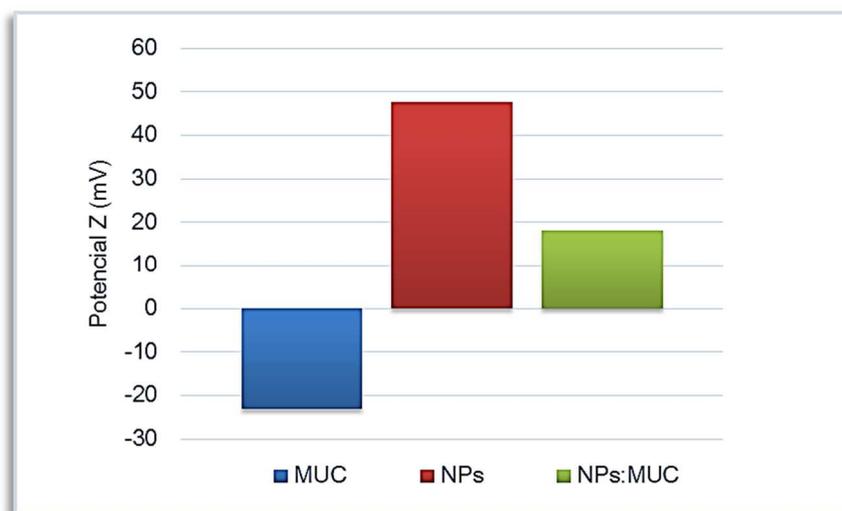


Figura 3.15: Valores de Potencial Z de: azul, MUC; rojo, NPS cargadas y, verde, NPs cargadas en contacto con MUC.

3.2.3.1.2 Determinación por SEM

Se utilizó la técnica SEM para demostrar las propiedades mucoadhesivas de las NPs de CHI. Este método se basó en detectar cambios en la estructura de la mucina luego de la adición de un sistema mucoadhesivo, como son estas NPs.

Aunque el 95% del mucus es agua, la preparación biológica de las muestras para SEM considera la fijación, la deshidratación y el secado, de las mismas. Tales procedimientos modifican la estructura filamentosa y delicada de las matrices de la glicoproteína, debido a que se encuentran extremadamente hidratadas (Familiari y col., 2007). Por lo tanto, en orden de permitir la observación de la microarquitectura real de las matrices de mucina y preservar la matriz filamentosa del estrés mecánico inducido por la deshidratación y la fijación, minimizando el empaquetamiento y la contracción, es que en este estudio no se usó el procedimiento de fijación y de deshidratación, para preparar las muestras de SEM. Así, las muestras hidratadas y sin fijar, presentaron la estructura del mucus de una manera más cercana a la situación *in vivo*.

En la figura 3.16, se muestran imágenes de SEM del gel de MUC, en una solución tamponada de fosfato de pH 7,4. En ella se pudo apreciar la estructura hinchada de las glicoproteínas de mucina; la cual, en su estado hidratado, tiene las fibras expandidas en forma continua.

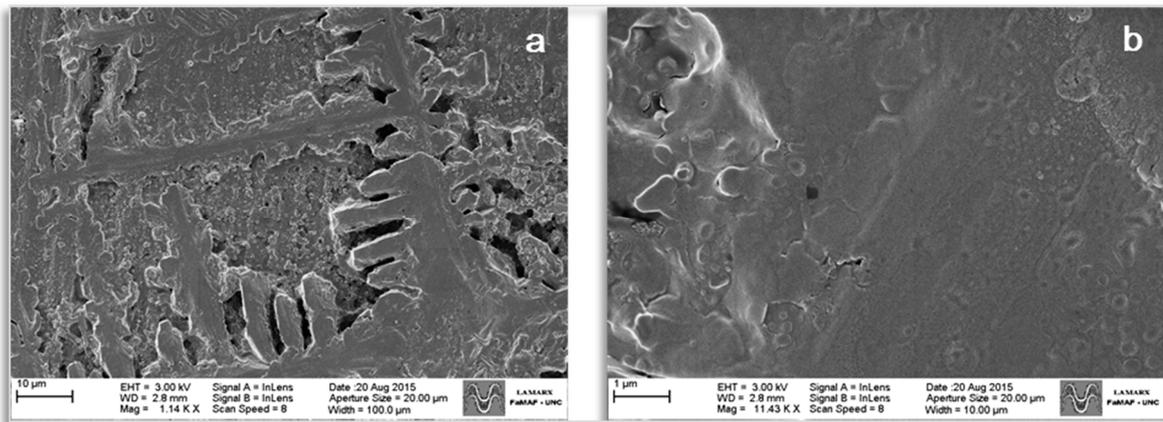


Figura 3.16: SEM mucina. a) Escala 10 µm, 1140x. b) Escala 1 µm, 11430x.

En las imágenes de SEM correspondientes a las muestras de MUC:NPs, se pudo detectar un cambio muy evidente en la microarquitectura de la MUC. Se observó una reorganización de las fibras de MUC, con la aparición de numerosos poros y la formación de filamentos compactos en la estructura de la misma; probablemente debido a la deshidratación del gel de MUC (Znamenskaya y col., 2012), inducido por el CHI, ya que se encontraron NPs muy pequeñas, adheridas a los filamentos de mucina. Estos cambios evidenciaron la existencia de interacciones entre los componentes de la muestra.

En la figura 3.17 se presentan las imágenes de mayor a menor escala, desde 30 µm a 200 nm, en donde se pueden observar claramente los cambios mencionados.

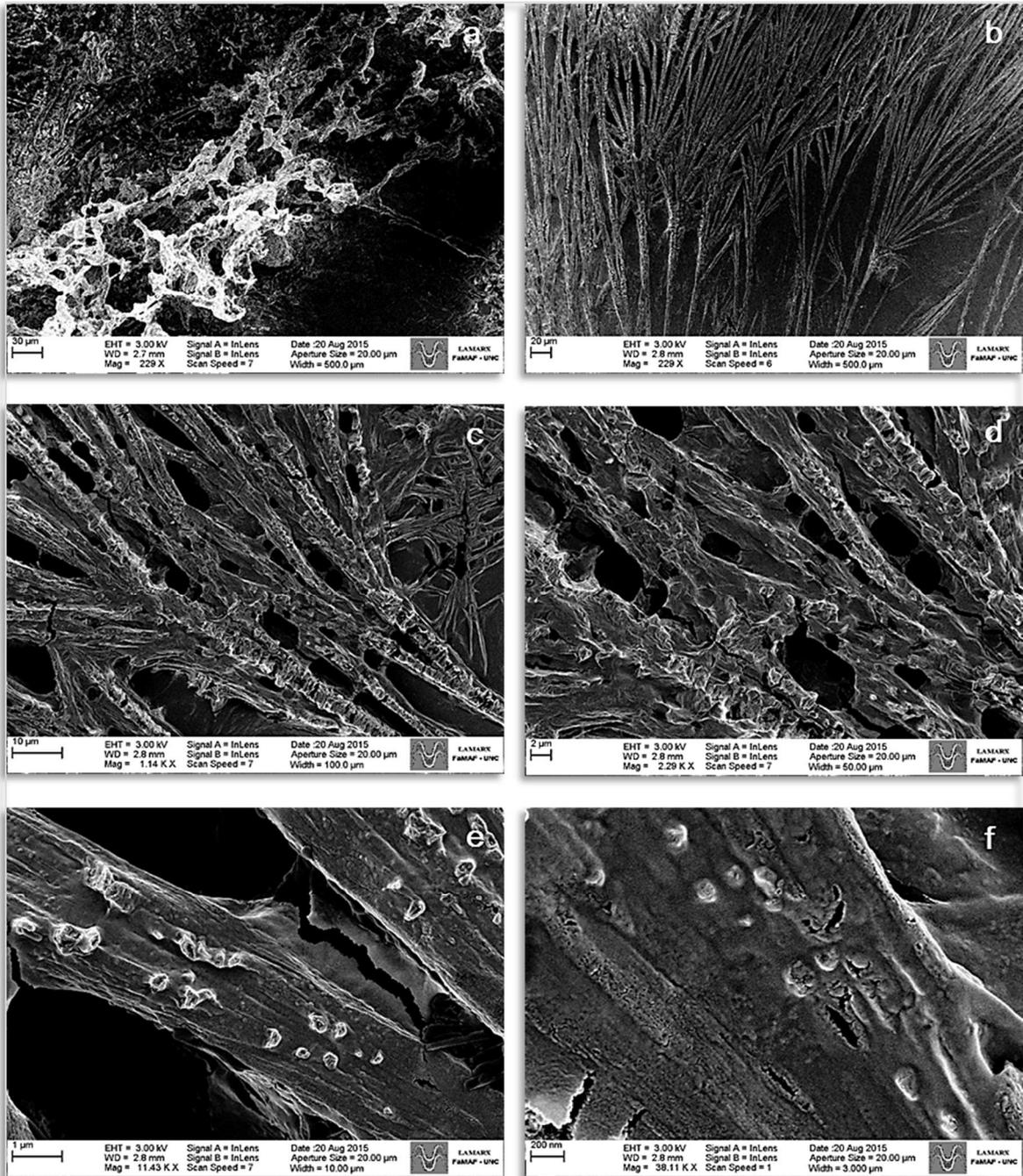


Figura 3.17: SEM de mucina con NPs. a) Escala 30 μm , 229x. b) Escala 20 μm , 229x. c) Escala 10 μm , 1140x. d) Escala 2 μm , 2290x. e) Escala 1 μm , 11430x. f) Escala 200 nm, 38110x.

3.2.3.2 Estudios de Viabilidad Intestinal

Para evaluar la integridad del tejido intestinal durante los estudios de permeabilidad realizados, se llevaron a cabo estudios de viabilidad. Estos estudios consistieron en medir la capacidad que tienen los segmentos intestinales para concentrar glucosa activamente en la solución serosal (Lifschitz y col., 2009).

Se cuantificó la cantidad de glucosa presente en la solución serosal, siguiendo el protocolo de trabajo propuesto.

Los resultados demostraron que, los segmentos intestinales utilizados durante los ensayos de permeabilidad llevados a cabo con las NPs cargadas con el complejo HCT/ β CD, fueron capaces de concentrar glucosa en la solución serosal, durante los 120 min que duró el estudio, por lo que los tejidos se mantuvieron viables y conservaron su integridad.

Mientras que, los ensayos realizados con la HCT sola, presentaron resultados diferentes. Se observó una disminución en la capacidad del tejido intestinal de concentrar glucosa en la solución serosal. Si bien no perdió su integridad macroscópica, estos resultados sugieren que existe algún daño en la superficie intestinal.

En el gráfico de la figura 3.18, se presentan los resultados de los estudios de viabilidad de los tejidos intestinales utilizados.

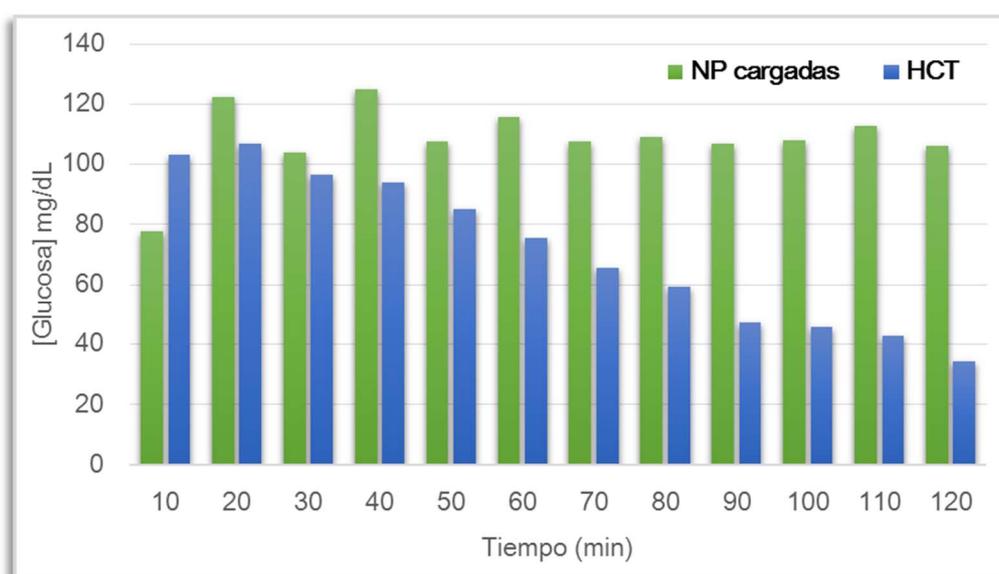


Figura 3.18: Viabilidad intestinal, [glucosa] mg/mL vs tiempo (min).

3.2.3.3 Técnica Bioanalítica

3.2.3.3.1 Extracción en Fase Sólida

El procedimiento de extracción en fase sólida utilizado, demostró ser eficiente ya que permitió aislar la HCT de la matriz biológica, por medio de un procedimiento sencillo. Además, permitió la concentración de la muestra, lo cual mejoró las condiciones para la cuantificación del principio activo por HPLC.

Se evaluó la recuperación, tanto de la HCT como del estándar interno utilizado, la cafeína.

La **recuperación** de un analito en un ensayo, es la respuesta obtenida por el detector a partir de una cantidad de analito añadido y extraído de la matriz biológica, en comparación con la respuesta obtenida por el detector para la concentración real del analito puro. Se refiere a la eficiencia de recuperación de la extracción de un método analítico dentro de los límites de variabilidad. La recuperación de la extracción no necesita ser del 100%, pero el grado de recuperación de un analito y del estándar interno debe ser consistente, preciso y reproducible. Los experimentos de recuperación deben llevarse a cabo mediante la comparación de los resultados analíticos de las muestras extraídas a tres niveles de concentración (baja, media y alta) con las muestras sin extraer que representan una recuperación del 100% (FDA, 2001).

Con el fin de evaluar la recuperación, se trabajó con tres concentraciones de las utilizadas para la curva de calibrado, baja ($3,36 \times 10^{-8}$ M), media ($3,36 \times 10^{-7}$ M) y alta ($3,36 \times 10^{-6}$ M), manteniendo constante la concentración del estándar interno ($1,9 \times 10^{-5}$ M). Cada una de ellas se inyectó por triplicado y con los valores obtenidos se realizó el análisis estadístico. Los porcentajes calculados de recuperación, en todos los casos, estuvieron entre el 90 y 100 % del valor esperado, siendo estos resultados reproducibles. En la tabla 3.3 se presentan los porcentajes de la recuperación, con la desviación estándar (DS) correspondiente.

Tabla 3.3: Porcentajes de la recuperación.

| Muestra | Concentración (M) | % Recuperación (\pm DS) |
|---------|-----------------------|----------------------------|
| HCT | $3,36 \times 10^{-8}$ | 91 ± 9 |
| | $3,36 \times 10^{-7}$ | 98 ± 4 |
| | $3,36 \times 10^{-6}$ | 95 ± 2 |
| STD | $1,9 \times 10^{-5}$ | 93 ± 1 |

3.2.3.3.2 Validación de la Técnica Cromatográfica

La validación del procedimiento analítico involucra documentar que las características del método son adecuadas y confiables para la aplicación analítica a la cual será destinado. La aceptación de los datos analíticos se corresponde directamente con los criterios utilizados para validar el método (FDA, 2001; Ich, 2005):

❖ La **selectividad** es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de otros componentes, como por ejemplo impurezas, metabolitos, matriz, etc.

❖ La **linealidad** de un método analítico es su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo determinado. La linealidad debe establecerse a lo largo del intervalo del procedimiento analítico por medio de un método estadístico apropiado (por ejemplo, cálculo de regresión por cuadrados mínimos). Los datos obtenidos a partir de la mejor recta, pueden ser útiles para estimar matemáticamente el grado de linealidad. Deben informarse el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto de la recta de regresión (Quattrocchi y col., 1992):

- El coeficiente de correlación, r^2 , se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto.

- La pendiente, a , es un parámetro indicativo de la sensibilidad del método o bien, sirve para evaluar la correlación de diferentes métodos.

- El intercepto, b , se calcula para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse a un error aleatorio.

❖ La **sensibilidad** del método se describe teniendo en cuenta los parámetros de Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC).

- El LD de un procedimiento analítico individual, es la cantidad más baja de analito en una muestra que se puede detectar, pero no necesariamente cuantificar como un valor exacto.

- El LC de un procedimiento analítico individual, es la cantidad más baja de analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas.

Ambos parámetros pueden determinarse por el análisis de muestras con concentraciones conocidas del analito y estableciendo el mínimo nivel al cual dicho analito puede ser detectado o cuantificado en forma confiable, según corresponda.

❖ La **precisión** de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de un muestreo múltiple de la misma muestra homogénea en las condiciones descritas. La precisión puede considerarse en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

- La *repetibilidad* expresa la precisión en las mismas condiciones de funcionamiento durante un corto intervalo de tiempo. También se denomina precisión intra-día.

- La *precisión* intermedia expresa variaciones intra-laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.

- La *reproducibilidad* expresa la precisión entre laboratorios (estudios en colaboración), por lo general se aplica a la estandarización de la metodología.

❖ La **exactitud** es también conocida como error sistemático o tendencia, y corresponde a la diferencia entre el valor medido y el valor verdadero obtenido, a partir de la concentración de la muestra y la curva de calibrado, para tres

niveles de concentraciones (baja, media y alta). Se calcula como se señala en la ecuación 3.4.

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Área observada}}{\text{Área esperada}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Para evaluar la **selectividad** del método cromatográfico propuesto, se realizaron diferentes corridas, con muestras del medio de cultivo TC199 y de HCT con estándar interno en medio de cultivo TC199, para luego comparar los cromatogramas obtenidos. Las muestras se acondicionaron utilizando el procedimiento de EFS, anteriormente descrito.

El cromatograma obtenido demostró que el método propuesto fue selectivo ya que no se observaron interferencias entre los analitos y la matriz biológica. En la figura 3.19, se muestra en rosa, la matriz biológica sola y, en azul, la matriz con los analitos, observándose claramente la resolución de los picos de cada compuesto analizado. El tiempo de retención para la HCT fue de 2,8 min y para el estándar interno fue de 6,3 min; a los 8 min comenzó a eluir la matriz biológica. El gradiente de solventes modificó la línea de base, pero en este caso no es significativo, ya que no se cuantifica ningún analito en esa etapa de la corrida. Los resultados se presentan en la tabla 3.4.

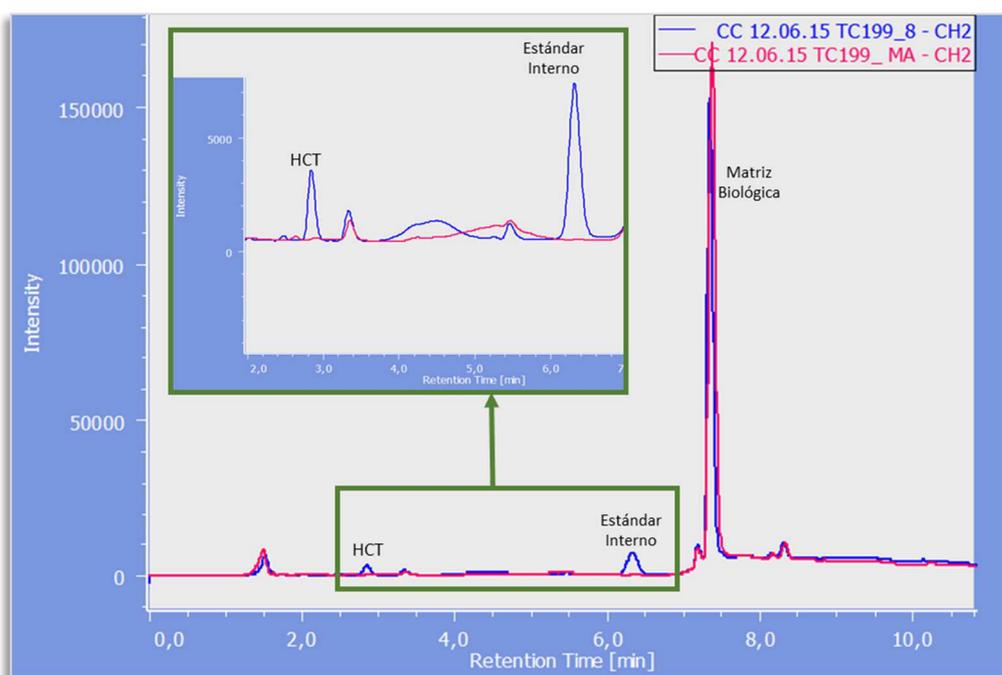


Figura 3.19: Cromatograma obtenido por HPLC.

Tabla 3.4: Tiempos de retención.

| Muestra | Tiempo de Retención (min) |
|------------------|---------------------------|
| HCT | 2,8 |
| Estándar interno | 6,3 |
| Matriz biológica | 8 |

Las curvas de calibrado se llevaron a cabo en el rango de concentraciones propuesto, por triplicado y aplicando el procedimiento de EFS. Para evaluar la **linealidad** de estas curvas se realizó un análisis estadístico de regresión lineal de los datos obtenidos, área analito/área del estándar interno en función de la $[Analito] M/[estándar\ interno] M$.

En el gráfico de la figura 3.20 se presenta la curva de calibrado con la ecuación de ajuste, $y = (1,79 \pm 0,02)x + (0,0004 \pm 0,0001)$, $r^2 = 0,9992$. Estos resultados indicaron que se cumple la linealidad en todo el rango de trabajo.

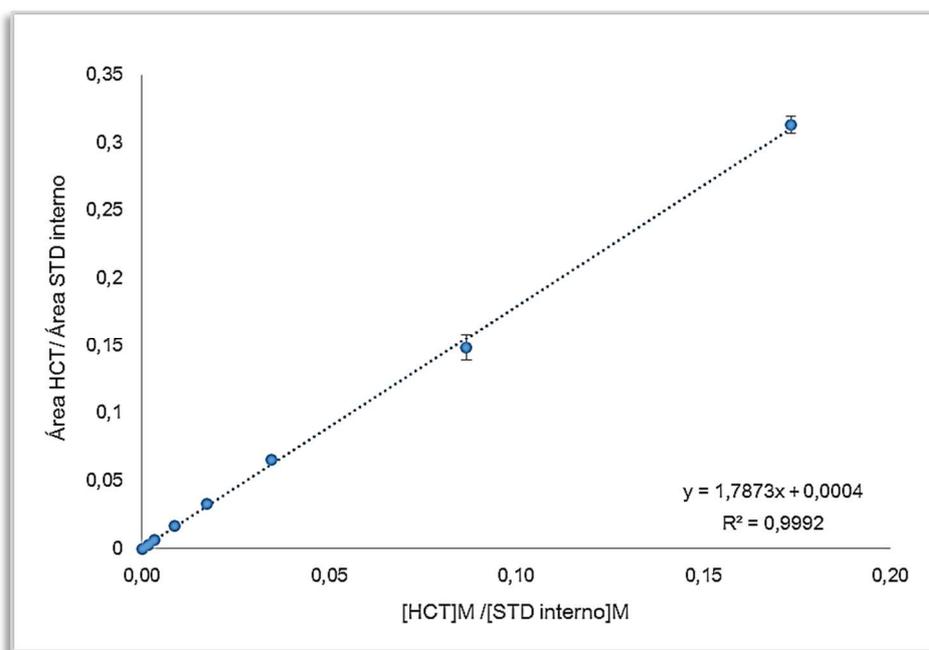


Figura 3.20: Curva de calibrado de HCT en medio de cultivo TC199, área HCT/área estándar interno vs $[HCT] M/[estándar\ interno] M$.

La **sensibilidad** del método se describe en términos de límite de detección y límite de cuantificación, para lo cual se analizaron muestras de diferentes concentraciones, cada vez menores. Se encontró que la mínima cantidad detectable y cuantificable de principio activo correspondió a una concentración de HCT de $1,78 \times 10^{-8}$ M.

Con el fin de evaluar la **precisión y la exactitud**, se trabajó con tres concentraciones de la curva de calibrado, baja ($3,36 \times 10^{-8}$ M), media ($3,36 \times 10^{-7}$ M) y alta ($3,36 \times 10^{-6}$ M). Cada una de ellas se inyectó por triplicado y con esos valores se realizó el análisis estadístico. Primero se calculó el promedio de los valores y su correspondiente DS; y con estos datos se calculó el coeficiente de variación (CV), utilizando la ecuación 3.5.

$$CV = \frac{DS}{Promedio} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.5}$$

El CV calculado, para la precisión inter e intra día, fue menor al 10%. Si bien, el criterio de aceptación suele ser $CV < 2\%$; cuando se trabaja con fluidos biológicos, se considera la complejidad de la matriz, resultando apropiado un CV de entre el 5 - 10% (Quattrocchi y col., 1992). Por otra parte, los CV para la determinación de la exactitud estuvieron entre el 90 y 110 % del valor esperado. Por lo tanto, los CV calculados cumplen con los criterios de aceptación. Los resultados se presentan en la tabla 3.5.

Tabla 3.5: Resultados de la validación.

| [HCT] M | % Exactitud (\pm DS) | % Precisión (\pm DS) | |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| | | Intra día | Inter día |
| $3,36 \times 10^{-8}$ | 88 ± 9 | $7,88 \pm 0,02$ | $5,59 \pm 0,02$ |
| $3,36 \times 10^{-7}$ | 108 ± 5 | $0,55 \pm 0,02$ | $1,98 \pm 0,06$ |
| $3,36 \times 10^{-6}$ | 103 ± 2 | $0,99 \pm 0,31$ | $1,91 \pm 0,60$ |

En base a los resultados obtenidos, se pudo afirmar que el método bioanalítico desarrollado fue exitosamente validado.

3.2.3.3 Estudios de Estabilidad

La estabilidad en medio de cultivo TC199 (pH 7,4), se llevó a cabo por 2 h a 37 °C, simulando las condiciones en las cuales se realizaron los ensayos de permeabilidad con los segmentos intestinales de ratas. Una vez transcurrido el tiempo previsto del ensayo, se tomaron muestras de la suspensión y por DLS se determinó el tamaño y el PDI de las partículas allí presentes.

Si bien, a simple vista, no se observó una separación de fases, por DLS se determinó la formación de grandes agregados, lo cual indicó que las NPs no se rompieron por estar en contacto con el medio de cultivo ni por efecto de la temperatura. Estos mismos resultados se observaron al hacer los estudios de estabilidad con soluciones tamponadas a pH 7,4.

3.2.3.4 Análisis de los Datos

Para estudiar la permeabilidad intestinal existen diversos modelos, dentro de los cuales se pueden clasificar en los siguientes grupos: *in vitro* (*ex vivo* y cultivos celulares), *in situ* e *in vivo*. Los modelos *in vitro* son los más utilizados, por la gran variedad de técnicas que existen; permiten incorporar al análisis diferentes eventos fisiológicos que resultan de interés. Dentro de este grupo se encuentran metodologías que utilizan tejidos animales aislados (*ex vivo*), o las que emplean cultivos celulares de distinto tipo. Por su parte, los modelos *in situ*, requieren de un animal de experimentación anestesiado y preparado mediante un procedimiento quirúrgico para mantener la inervación e irrigación sanguínea en el tejido intestinal. En los modelos *in vivo*, se administra una dosis oral del fármaco ensayado y luego se determina el perfil de concentración plasmática en función del tiempo. Si las condiciones experimentales son las adecuadas, este modelo es el que arroja mayor información (Gualdesi, 2013).

La absorción intestinal puede ocurrir mediante diferentes procesos, dentro de los cuales podemos mencionar: difusión pasiva (vía paracelular o vía transcelular), pasaje mediado por transportadores, trancitosis y endocitosis. A

continuación, en la figura 3.21 se presenta un esquema, a fin de ejemplificar dichos procesos.

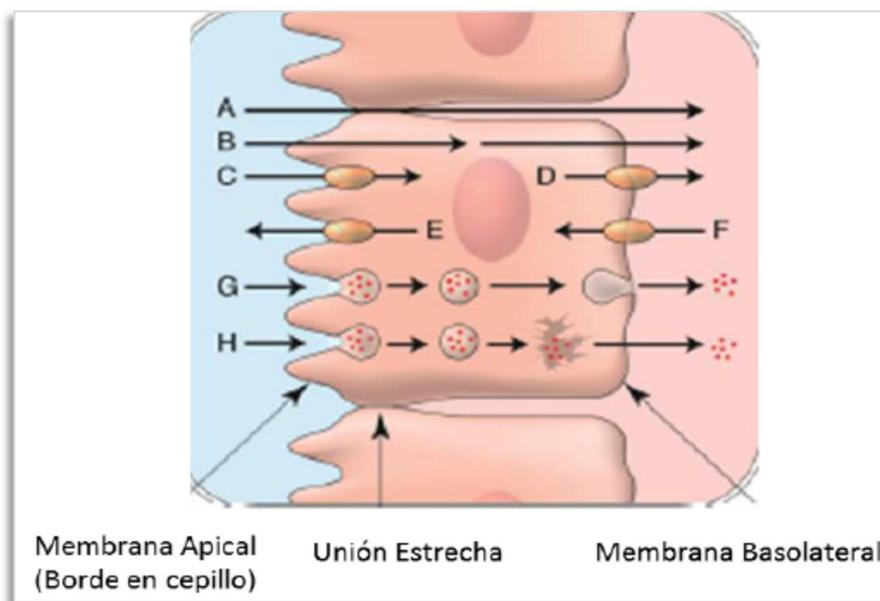


Figura 3.21: Procesos de absorción intestinal. A) Difusión pasiva – vía paracelular. B) Difusión pasiva – vía transcelular. C-F) Pasaje mediado por transportadores. G) Transcitosis. H) Endocitosis.

En este trabajo de tesis, los ensayos de permeabilidad se realizaron utilizando una técnica *in vitro*, denominada técnica de saco intestinal evertido de ratas, para evaluar la permeabilidad intestinal de la HCT acomplejada con la β CD y, a su vez, encapsulada en las NPs.

Para poder predecir la permeabilidad intestinal es importante considerar que están involucrados procesos previos, como la liberación del fármaco desde las formas de dosificación empleadas (Fontestad y col., 2008) y que, para obtener el valor del coeficiente de permeabilidad aparente, es necesario conocer la concentración del fármaco libre y disponible para su absorción. Debido a que la cantidad inicial de HCT no es posible determinarla con exactitud, ya que el principio activo debe liberarse desde la NPs y posteriormente, de su complejo con la β CD, se estimó la cantidad de HCT presente en el sistema nanoparticulado y la cantidad de fármaco libre disponible para permear. Los *pellets* de NPs utilizados en los ensayos de permeabilidad, contenían aproximadamente $(350 \pm$

130) μg de HCT acompañada con βCD , la cual fue cuantificada empleando un método indirecto, como se describió en la sección 3.1.2.2. Por otra parte, la cantidad de HCT libre disponible para la absorción, se estimó cuantificando la solución mucosal al finalizar el ensayo de permeabilidad; allí se encontró que, en promedio, la cantidad de fármaco libre en equilibrio con el fármaco encapsulado, fue de (75 ± 20) μg de HCT. La cantidad de complejo encapsulado en cada *pellet* es variable, por lo tanto fue necesario cuantificar, la cantidad de HCT/ βCD en cada muestra, y la cantidad de principio activo libre presente en la solución mucosal final, de cada ensayo realizado. Se informan los promedios de los resultados obtenidos y a partir de ahora, para hacer referencia a la HCT proveniente de las NPs, se la denomina $HCT_{(NPs)}$.

Como control se hicieron los estudios de permeabilidad con la HCT sola. Para evaluar el efecto de la concentración de este fármaco sobre la permeabilidad intestinal del mismo, los estudios se llevaron a cabo con cantidades equivalentes del principio activo encapsulado en las NPs, y con cantidades equivalentes de IFA libre en la solución mucosal, por lo tanto, se realizaron ensayos con 750 y 50 μg iniciales de principio activo, disueltos en la solución mucosal. Para hacer referencia a la HCT, proveniente de los ensayos control, con 750 y con 50 μg de fármaco, se las denominó $HCT_{(750 \mu\text{g})}$ y $HCT_{(50 \mu\text{g})}$, respectivamente.

Se obtuvieron los perfiles de permeabilidad para cada una de las muestras, graficando μg de HCT permeados en función del tiempo (min).

Analizando los perfiles obtenidos de los ensayos de permeabilidad, realizados con HCT sola, con las diferentes cantidades iniciales (750 y 50 μg), se observó que estos perfiles no eran lineales (figura 3.22), distinguiéndose claramente un cambio de pendiente a los 60 min. Considerando esto, se analizaron las porciones lineales por separado: porción inicial, desde los 10 – 60 min; porción final, desde los 70 – 120 min; obteniéndose dos valores de pendiente para cada perfil. Con los valores de las pendientes se determinó la velocidad de absorción (flujo) y con ella, el coeficiente de P_{app} .

Para la $HCT_{(750 \mu\text{g})}$ la velocidad de absorción de la porción inicial fue de $(3 \pm 2) \times 10^{-2}$ $\mu\text{g}/\text{min}$ y la P_{app} de $(7,5 \pm 2,0) \times 10^{-5}$ cm/min ; mientras que para la porción final, el flujo fue de $(8 \pm 1) \times 10^{-2}$ $\mu\text{g}/\text{min}$ y la P_{app} de $(1,9 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ cm/min . En

el caso de HCT_(50 µg), la velocidad de absorción de la porción inicial fue de $(3 \pm 1) \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{min}$ y la P_{app} de $(6,8 \pm 4,3) \times 10^{-5} \text{ cm}/\text{min}$; y en la porción final, el flujo fue de $(7 \pm 3) \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{min}$ y la P_{app} de $(2,6 \pm 1,1) \times 10^{-4} \text{ cm}/\text{min}$.

Debido a que la velocidad de absorción depende de la concentración inicial de fármaco, es evidente que el flujo para HCT_(750 µg) es mucho mayor que para HCT_(50 µg), lo cual se corroboró estadísticamente, demostrando que los resultados son diferentes ($F > F_{\text{crítico}}$). Es por esta razón que, lo apropiado fue comparar los coeficientes de P_{app} , ya que son independientes de la concentración inicial de fármaco. En este caso, se observó que los resultados son estadísticamente similares, cumpliéndose para el ANOVA que $F < F_{\text{crítico}}$. En la tabla 3.6 se presentan los resultados.

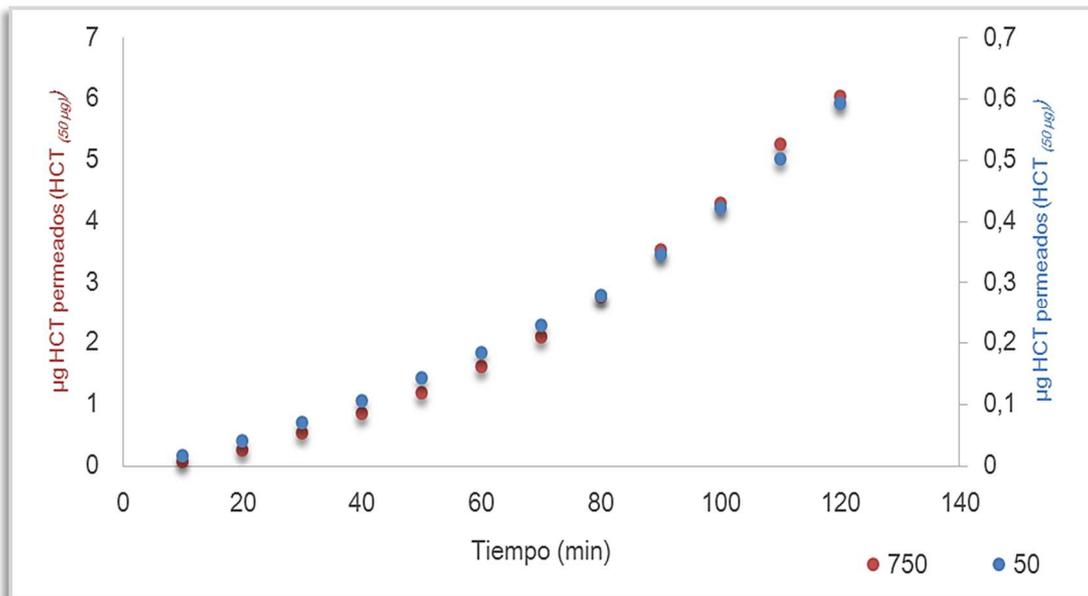


Figura 3.22: Perfiles de permeabilidad de HCT_(750 µg) y de HCT_(50 µg), µg HCT permeados vs tiempo (min).

Tabla 3.6: Resultados obtenidos para $HCT_{(750 \mu g)}$ y $HCT_{(50 \mu g)}$.

| Parámetro | Porción de la recta | Muestra | | ANOVA | |
|--|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------|----------------------|
| | | HCT $(750 \mu g)$ n = 3 | HCT $(50 \mu g)$ n = 3 | f | f _{crítico} |
| Flujo ($\mu g/min$) ($\pm DS$) | 10 – 60 min | $(3 \pm 2) \times 10^{-2}$ | $(3 \pm 1) \times 10^{-3}$ | 10,6 | 10,1 |
| | 70 – 120 min | $(8 \pm 1) \times 10^{-2}$ | $(7 \pm 3) \times 10^{-3}$ | 92,2 | 10,1 |
| P _{app} (cm/min) ($\pm DS$) | 10 – 60 min | $(7,5 \pm 2,0) \times 10^{-4}$ | $(6,8 \pm 4,4) \times 10^{-5}$ | 0,04 | 10,1 |
| | 70 – 120 min | $(1,9 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ | $(2,6 \pm 1,1) \times 10^{-4}$ | 0,7 | 10,1 |

Considerando que la cantidad de HCT libre, disponible para permear a partir de las NPs, es aproximadamente $(75 \pm 20) \mu g$, es que se realizó el análisis de los datos, comparando los resultados obtenidos para la $HCT_{(NPs)}$ y la $HCT_{(50 \mu g)}$.

Al comparar los perfiles de permeabilidad obtenidos para estas muestras, figura 3.23, se encontró que el perfil de absorción de $HCT_{(NPs)}$ es lineal, mientras que el mismo perfil para $HCT_{(50 \mu g)}$ no lo fue. Los resultados obtenidos para $HCT_{(NPs)}$ fueron, la velocidad de absorción de $(1,8 \pm 0,1) \times 10^{-3} \mu g/min$ y la P_{app} de $(4,9 \pm 1,6) \times 10^{-5} cm/min$.

En los perfiles presentados en el gráfico de la figura 3.23, se pudo observar que en los primeros 60 min, ambos perfiles tuvieron la misma velocidad de absorción ($f < f_{crítico}$); mientras que luego, en el caso de la $HCT_{(50 \mu g)}$ el flujo aumentó, lo cual se comprobó estadísticamente ($f > f_{crítico}$), ya que los perfiles dejan de ser iguales. Lo mismo ocurrió con el coeficiente de P_{app} , son similares en la porción inicial del perfil, y luego la P_{app} , en el caso de $HCT_{(50 \mu g)}$ aumenta, este resultado también se corrobora estadísticamente. Es importante aclarar que el valor de P_{app} para la HCT, que proviene de las NPs, es solo un valor estimado, debido a que no se conoce exactamente la concentración inicial de HCT presente en la solución mucosal, sino que se cuantifica la cantidad de HCT libre, al finalizar el estudio y con ese valor se estimó la P_{app} . Los resultados se presentan en la

tabla 3.7, el análisis estadístico se realizó relacionando los datos de la $HCT_{(NPs)}$ con cada porción de los datos de $HCT_{(50 \mu g)}$.

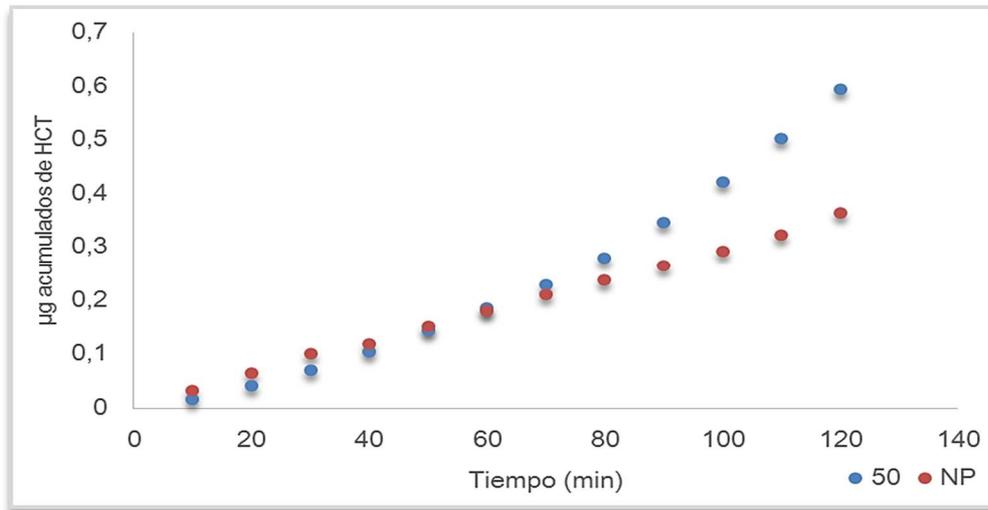


Figura 3.23: Perfiles de permeabilidad de $HCT_{(50 \mu g)}$ y de $HCT_{(NPs)}$, μg HCT permeados vs tiempo (min).

Tabla 3.7: Resultados obtenidos para $HCT_{(50 \mu g)}$ y $HCT_{(NPs)}$.

| | Muestra | | | |
|--------------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| | Porción de la recta | $HCT_{(50 \mu g)}$ n = 3 | $HCT_{(Nps)}$ n = 3 | ANOVA f $f_{crítico}$ |
| Flujo ($\mu g/min$) | 10 – 60 min | $(3 \pm 1) \times 10^{-2}$ | | 4,6 7,7 |
| | 70 – 120 min | $(7 \pm 3) \times 10^{-3}$ | | 0,5 7,7 |
| ($\pm DS$) | 10 – 120 min | | $(1,7 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ | |
| P_{app} (cm/min) | 10 – 60 min | $(6,8 \pm 4,4) \times 10^{-5}$ | | 11,2 7,7 |
| | 70 – 120 min | $(2,6 \pm 1,1) \times 10^{-4}$ | | 12,3 7,7 |
| ($\pm DS$) | 10 – 120 min | | $(4,9 \pm 1,6) \times 10^{-5}$ | |

Teniendo en cuenta que las NPs tenían encapsulada una cantidad equivalente de HCT de aproximadamente $(350 \pm 130) \mu g$, es que se realizaron los estudios de permeabilidad con una mayor cantidad de HCT solubilizada en la solución mucosal. Estos resultados permitieron evaluar el comportamiento del

sistema de liberación obtenido, en base a la comparación de la velocidad de absorción que tiene el fármaco solo.

Comparando los dos valores obtenidos de flujo para HCT_(750 µg), $(3 \pm 2) \times 10^{-2}$ y $(8 \pm 1) \times 10^{-2}$ µg/min, con la velocidad de absorción obtenida para HCT_(NPs) $(3 \pm 1) \times 10^{-3}$ µg/min; es evidente que el flujo es mayor en el caso de HCT_(750µg), siendo los resultados, estadísticamente diferentes entre sí ($f > f_{\text{crítico}}$), ya que este parámetro, como se mencionó anteriormente, depende de la concentración inicial del fármaco. Si se tiene en cuenta que las cantidades iniciales en los dos casos son similares, estos resultados indicarían que las NPs estarían actuando efectivamente como un sistema de reservorio, liberando lentamente la HCT al medio. En cuanto a la P_{app}, considerando que este coeficiente es estimativo para el caso de HCT_(NPs), se puede observar que durante los primeros 60 min, tienen una P_{app} estadísticamente similar ($f < f_{\text{crítico}}$), pero que luego aumenta para el caso de HCT_(750 µg), cumpliéndose $f > f_{\text{crítico}}$. Los resultados se presentan en la tabla 3.8, nuevamente, el análisis estadístico se realizó relacionando los datos de la HCT_(NPs) con cada porción de los datos de HCT_(50 µg).

Tabla 3.8: Resultados obtenidos para HCT_(750 µg) y HCT_(NPs).

| | Muestra | | | |
|------------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| | Porción de la recta | HCT _(750 µg) n = 3 | HCT _(Nps) n = 3 | ANOVA f f _{crítico} |
| Flujo (µg/min) | 10 – 60 min | $(3 \pm 2) \times 10^{-2}$ | | 20,1 7,7 |
| | 70 – 120 min | $(8 \pm 1) \times 10^{-2}$ | | 6,2 7,7 |
| (±DS) | 10 – 120 min | $(1,8 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ | | |
| P _{app} (cm/min) | 10 – 60 min | $(7,5 \pm 2,0) \times 10^{-4}$ | | 64,9 7,7 |
| | 70 – 120 min | $(1,9 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ | | 108,1 7,7 |
| (±DS) | 10 – 120 min | $(4,9 \pm 1,6) \times 10^{-5}$ | | |

Cabe agregar que, durante la realización de estos estudios, se observó un cambio en la apariencia macroscópica de la mucina del mucus que cubre el

epitelio intestinal, en la solución mucosal. Se sabe, que los geles cuyas moléculas son capaces de realizar interacciones electrostáticas, se pueden expandir en más de mil veces su volumen original en presencia de agua. Dado que las mucinas son polianiones, sus expansiones están gobernadas además, por las interacciones atractivas de cationes libres con las cargas negativas de la mucina (Gésime y col., 2009).

Por lo tanto, se atribuye este cambio estructural, en la capa de mucus intestinal, a la presencia de las NPs, debido a que éstas poseen cargas positivas en la superficie capaces de interactuar electrostáticamente con las cargas negativas de la mucina. No se detectó este efecto, cuando se realizaron los ensayos con la HCT sola. Estos resultados respaldan las propiedades mucoadhesivas observadas del sistema nanoparticulado. En la figura 3.24 se muestran las soluciones mucosales al finalizar los ensayos con HCT en solución (a) y con NPs cargadas con HCT/ β CD (b).

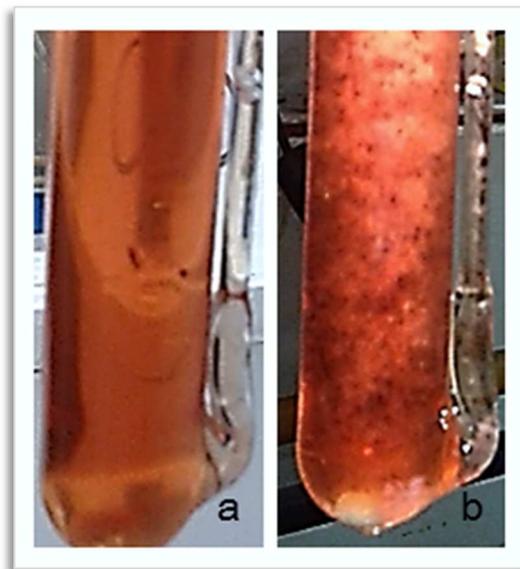


Figura 3.24: Fotografías tomadas de la solución mucosal al finalizar los ensayos de permeabilidad. a) Ensayo realizado con HCT. b) Ensayo realizado con NPs.

3.2.3.5 Estudios de Toxicidad Intestinal

El intestino delgado se extiende desde el píloro hasta la unión del ciego con el colon ascendente y se encuentra subdividido en: duodeno, yeyuno e íleon. Cualquiera que sea el nivel del intestino delgado, las paredes se encuentran conformadas por mucosa, submucosa, muscular y serosa. A continuación se realiza una descripción general de la mucosa y de su epitelio, ya que es el área de interés en esta sección.

La mucosa está conformada por: epitelio, lámina propia y muscular de la mucosa. El **epitelio de la mucosa** tiene pliegues circulares, que se proyectan hacia la superficie intestinal para luego hundirse de nuevo, conformando proyecciones a manera de dedos, llamadas vellosidades.

Las **vellosidades** son responsables de incrementar el área superficial de la mucosa intestinal en un factor de 10. La superficie de las vellosidades está tapizada por una sola hilera de células epiteliales de diversos tipos. La célula principal, llamada *célula de absorción*, es una célula alta columnar, con un núcleo basal, redondo u oval y con citoplasma eosinofílico.

Intercaladas entre las células de absorción se encuentran células, con escaso borde en cepillo, a nivel con una característica gota de mucina ácida y neutral a nivel apical, que les da forma de copa, y de ahí su nombre de *células calciformes*. La secreción de mucina mantiene un ambiente viscoso y húmedo en la superficie epitelial.

La superficie apical de las vellosidades, posee un borde en cepillo, el cual se halla compuesto de microvellosidades y glicocalix.

Las **microvellosidades** recubren las vellosidades intestinales y aumentan el área de absorción en un factor de 20. El *glicocalix*, se visualiza como proyecciones filamentosas desde la superficie de las microvellosidades, actuando como una barrera contra microorganismos y sustancias extrañas, además, contiene importantes enzimas como peptidasas y disacaridasas que intervienen en los procesos digestivos finales. El glicocalix es sintetizado por las células de absorción y luego transportado a la superficie de manera dinámica (Luis y col., 1996).

Las muestras de los segmentos intestinales, utilizados en los ensayos de permeabilidad de HCT_(750 μg) y HCT_(NPs), se analizaron por microscopía óptica de alta resolución (MOAR) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). El objetivo de comparar estas muestras fue demostrar que, administrando cantidades similares de principio activo en diferentes sistemas de liberación, como son las NPs o soluciones del fármaco, tienen diferentes efectos sobre el epitelio intestinal, lo cual repercute directamente en la P_{app} del fármaco. Las muestras de intestino recolectadas antes de comenzar el estudio se denominaron *control*, mientras que a las muestras que se tomaron después de realizados los estudios, ya sea con HCT sola o con *pellets* de NPs, se las denominaron *tratado*.

La microscopía óptica se sirve de la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto que colocamos sobre la platina para estudiar. Consiste en dos sistemas de lentes, el objetivo y el ocular, montados en extremos opuestos de un tubo cerrado. El objetivo está compuesto de varias lentes que crean una imagen real aumentada del objeto examinado. Las lentes de los microscopios están dispuestas de forma que el objetivo se encuentre en el punto focal del ocular, cuando se mira a través del ocular se ve una imagen virtual aumentada de la imagen real. El aumento total del microscopio depende de las longitudes focales de los dos sistemas de lentes. Tiene un poder de resolución de 0,2 μm.

El **MOAR** es un método histológico mediante el cual se evalúan cortes semifinos (150 – 200 nm) de muestras incluidas en resina, lo que le permite aprovechar al máximo el poder de resolución del microscopio de luz.

El microscopio electrónico es un aparato de alta precisión que permite ver objetos mucho más pequeños y texturas más finas que los microscopios ópticos, debido a que tiene mayor poder de resolución. Estos grandes aumentos se logran mediante el empleo de un haz de electrones en lugar de fotones, y bobinas en lugar de lentes. La información que se obtiene es producto de la interacción de los electrones con la muestra.

El TEM, permite evaluar la ultraestructura del material en estudio, analizando muestras ultrafinas (90 – 120 nm). Un haz de electrones de alta velocidad atraviesa la muestra generando imágenes sobre una placa que contiene fósforo; luego, estas señales forman una imagen en un monitor. En TEM, las imágenes y contrastes se construyen utilizando la transmisión de electrones de una muestra cuando ella es atravesada por un delgado haz de electrones de alta energía (usualmente 40 kV) (Mora, 2013).

Las imágenes obtenidas por MOAR, de la muestra *control*, se presentan en las figuras 3.25, a y b. Estas imágenes mostraron que las vellosidades del intestino están recubiertas por células epiteliales, las cuales responden a un patrón normal, en donde los núcleos se encuentran en la parte basal de la célula. Se detectó también la presencia de células calciformes.

Por TEM, se observó la morfología ultraestructural sana de las células epiteliales, con microvellosidades formando un borde de cepillo intacto (figura 3.25e) y sin pruebas de desprendimiento de las células en la superficie de la mucosa. La membrana celular y la membrana nuclear se muestran íntegras, distinguiéndose claramente los núcleos sanos y las mitocondrias en el citoplasma celular (figura 3.25c). Los complejos de unión intercelular denotaron buena adherencia célula a célula a lo largo de la membrana lateral, distinguiéndose la presencia de desmosomas y uniones adherentes (figura 3.25d).

En el caso del tejido intestinal *tratado* con HCT, las imágenes de MOAR evidenciaron una drástica alteración morfológica. En la figura 3.26 a y b, se observó claramente como desapareció por completo el epitelio que cubre las vellosidades, quedando simplemente la estructura de tejido conectivo. En la imagen se identificaron abundantes restos celulares y cuerpos apoptóticos.

En las microfotografías tomadas por TEM, a las muestras tratadas con HCT, se observó la presencia de fibras de colágeno que forman parte del tejido conectivo de las vellosidades y numerosas vacuolas (figura 3.26e), lo cual evidenció la muerte celular. Es llamativa la aparición de una gran cantidad de capilares sanguíneos (figura 3.26d), todos ellos fenestrados (figura 3.26f), los cuales son característicos de este epitelio, ya que permiten la permeación de

fármacos a través de los poros (fenestraciones) de 80 – 100 nm, que proveen canales a través de la pared del capilar (Ross & Pawlina, 2008).

En las imágenes de MOAR, obtenidas de las muestras del tejido intestinal *tratado* con **NPs cargadas con HCT/ β CD**, se detectó la presencia de vellosidades, en algunos casos recubiertas por un epitelio intacto; mientras que en otros, se observó el desprendimiento epitelial hasta desaparecer por completo, y restos celulares alrededor de las vellosidades. Esto podría evidenciar un posible efecto tóxico del fármaco (Westendorp y col., 2009). Estas imágenes se muestran en la figura 3.27 a – c.

Utilizando la técnica de TEM, fue posible identificar en el epitelio que recubre a las vellosidades, células calciformes, numerosas vacuolas dentro de las células y microvellosidades, pero en una considerable cantidad menor en comparación a la muestra control (figura 3.27d). Además, se observó desprendimiento celular con vacuolas, como se muestra en la figura 3.27e. Se identificaron también, uniones adherentes y desmosomas en las uniones celulares, y mitocondrias evidentemente deformadas, con aspecto redondeado y con disminución de las crestas mitocondriales, lo cual evidenciaría que la célula está estresada. Las imágenes mencionadas se presentan a continuación.

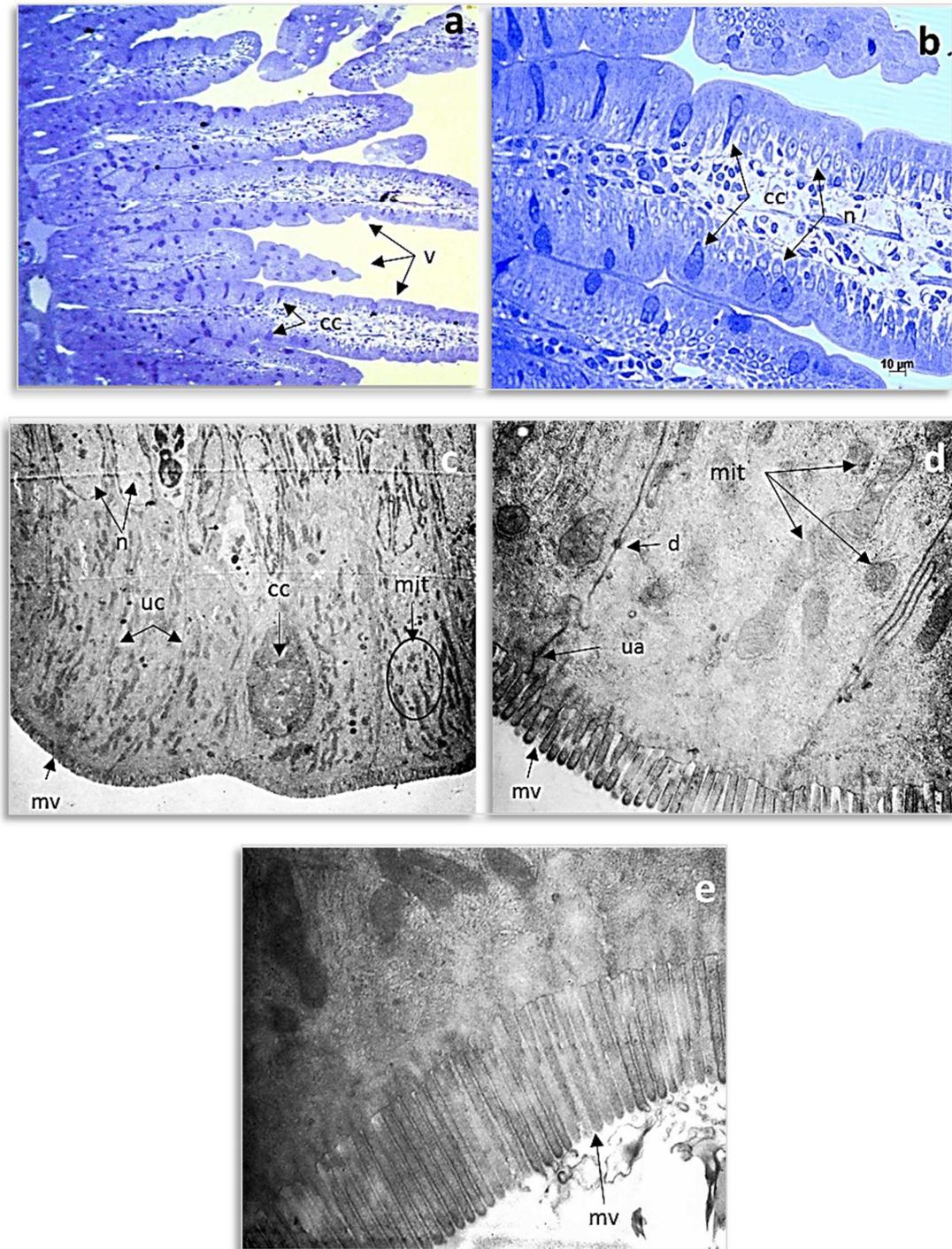


Figura 3.25: Microfotografías de intestino, *muestra control*. a) MOAR 10x. b) MOAR 40x. c) TEM 2156x. d) TEM 12930x. e) TEM 16700x. *v*, vellosidades; *mv*, microvellosidades; *cc*, células calciformes; *mit*, mitocondrias; *n*, núcleo; *d*, desmosomas; *uc*, uniones celulares; *ua*, uniones adherentes.

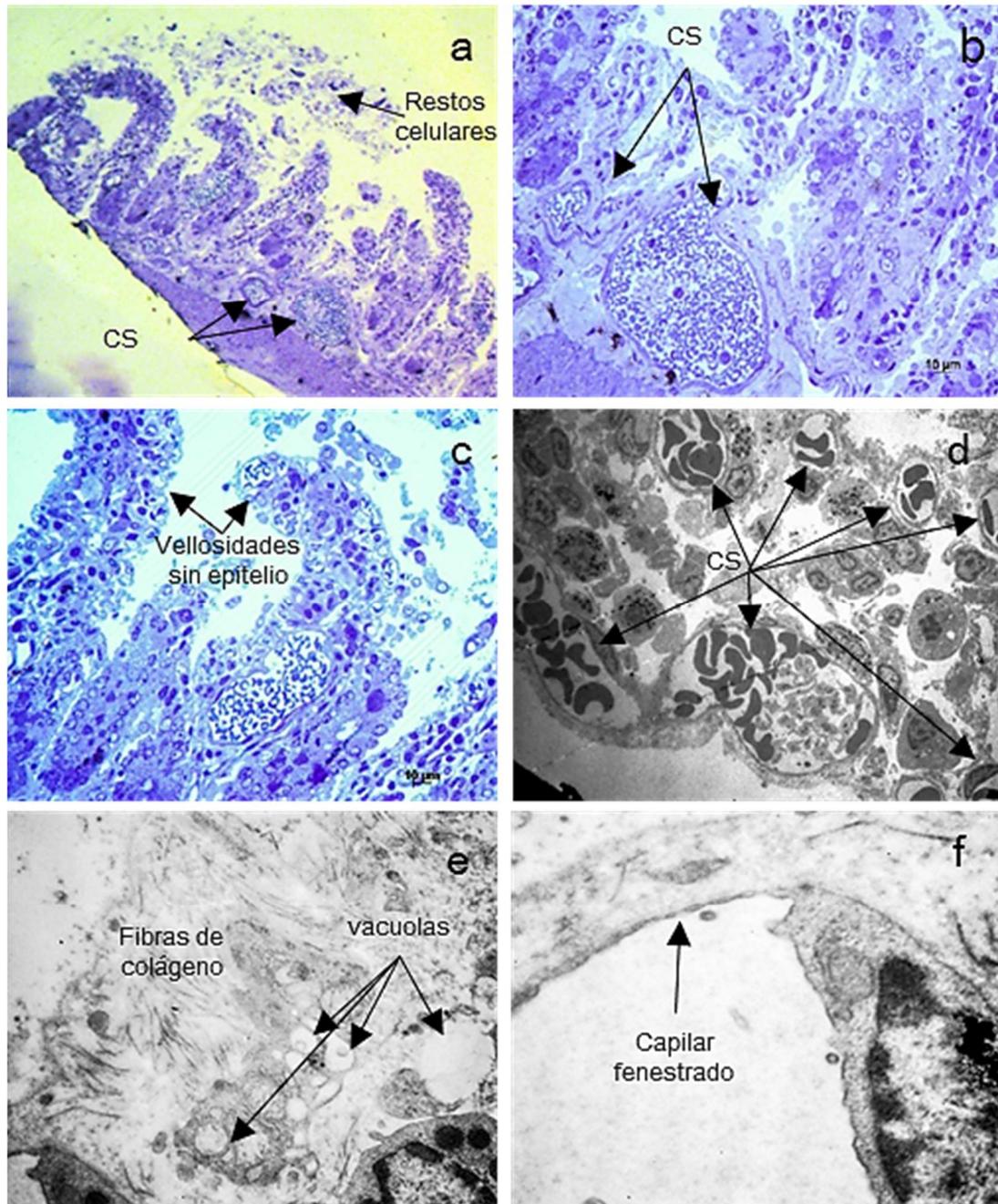


Figura 3.26: Microfotografías de *intestino tratado con HCT*. a) MOAR 10x. b) MOAR 40x. c) MOAR 40x. d) TEM 1293x. e) TEM 10000x. f) TEM 16700x. *cs*, capilares sanguíneos.

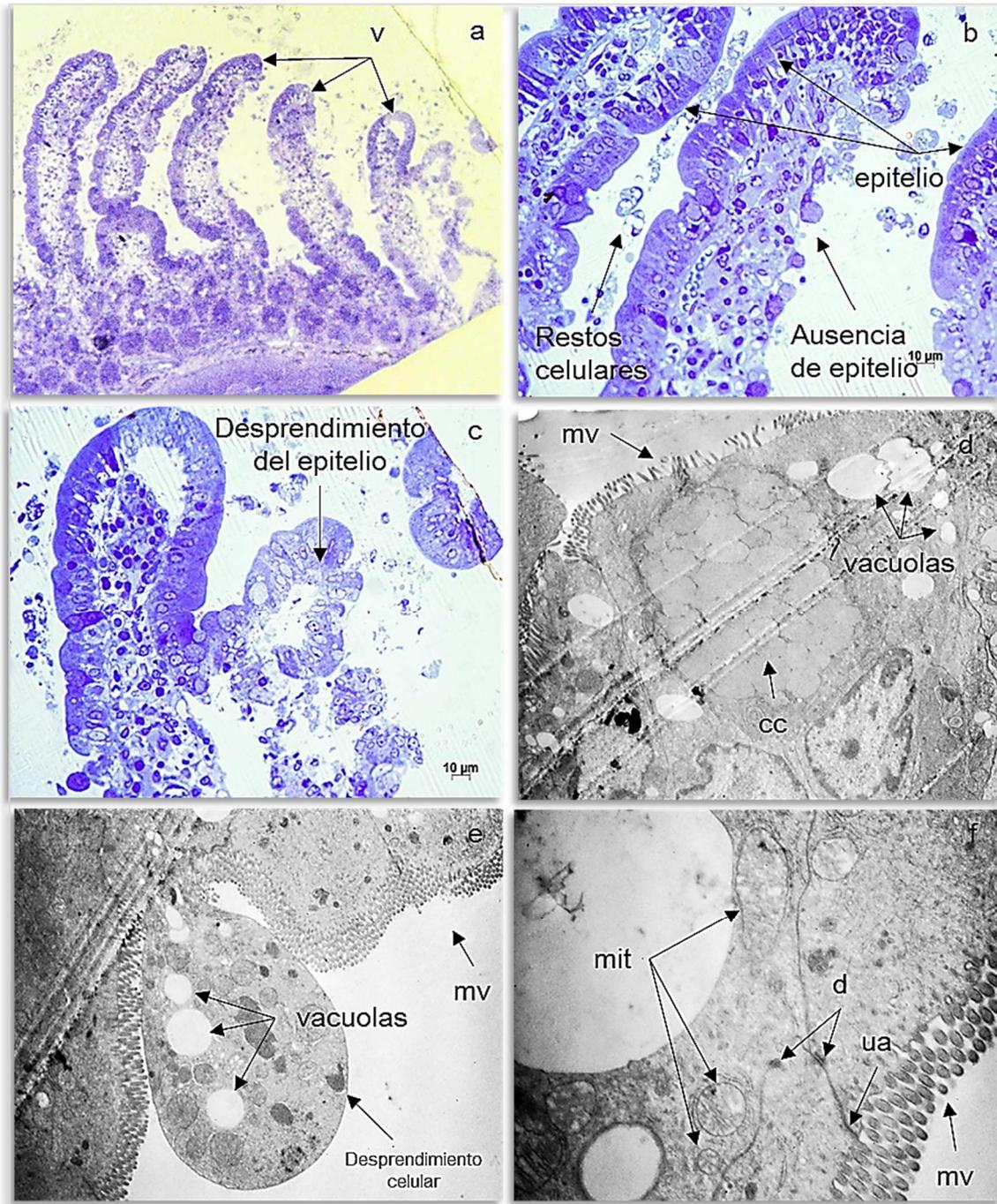


Figura 3.27: Microfotografías de intestino tratado con NPs cargadas con HCT/βCD. a) MOAR 10x. b) MOAR 40x. c) MOAR 40x. d) TEM 4646x. e) TEM 4646x. f) TEM 12930x. v, vellosidades; mv, microvellosidades; cc, células calciformes; mit, mitocondrias; d, desmosomas; ua, uniones adherentes.

3.2.4 Discusión

Los estudios de mucoadhesión se realizaron poniendo en contacto una suspensión de MUC con una suspensión de NPs, en soluciones tamponadas de pH 7,4. Los resultados obtenidos de estos estudios, evidenciaron que efectivamente las NPs cargadas con el complejo de HCT/ β CD tienen propiedades mucoadhesivas.

Una de las técnicas utilizadas en los estudios de mucoadhesión, fue la determinación del potencial Z, lo cual demostró que la carga superficial de las NPs disminuye al estar en contacto con la suspensión de MUC, evidenciando así, una interacción electrostática entre ambos compuestos.

Otra de las técnicas aplicadas en los estudios de mucoadhesión fue el SEM. En este caso, la mucoadhesión se demostró, por un cambio estructural de la MUC, observándose la formación de fibras compactas y poros. En las imágenes, se detectó la presencia de NPs, de aproximadamente 200 nm, adheridas a las fibras de MUC, demostrando así, que éstas efectivamente interactúan con la MUC. Este resultado sugiere también que, los agregados que se detectaron a pH 7,4, en los estudios de estabilidad, se rompieron al entrar en contacto con la MUC, lo cual, probablemente, promueva la liberación del principio activo desde el sistema nanoparticulado.

Los estudios de permeabilidad *in vitro* se realizaron utilizando la técnica de saco intestinal evertido de ratas. Los ensayos se llevaron a cabo con muestras de NPs cargadas con HCT/ β CD. Si bien, se había determinado que las NPs encapsulan un equivalente aproximado de (350 ± 130) μ g de HCT, se corroboró, al finalizar los estudios de permeabilidad, que aproximadamente (75 ± 20) μ g del principio activo estarían libres en la solución mucosal y por lo tanto, disponibles para su absorción. Los estudios de permeabilidad, realizados con la HCT como referencia, se llevaron a cabo teniendo en cuenta estos datos, es decir, se realizaron estudios de permeabilidad con cantidades iniciales de HCT en la solución mucosal de 50 y 750 μ g, a fin de reproducir las condiciones experimentales de las NPs. Para simplificar la discusión de los resultados obtenidos, se utiliza la misma nomenclatura para las muestras que la empleada

en la presentación de resultados: $HCT_{(NPs)}$, $HCT_{(50 \mu g)}$, $HCT_{(750 \mu g)}$ (Sección 3.2.3.4).

Los resultados de los estudios de permeabilidad realizados con $HCT_{(50 \mu g)}$ y con $HCT_{(750 \mu g)}$, demostraron que los perfiles de permeabilidad en ambos casos, no fueron lineales, ya que se observó un cambio de pendiente luego de los 60 min; dicha diferencia es estadísticamente significativa ($\neq f_{\text{crítico}}$). Esta observación sugiere que el fármaco induce cambios en el intestino, que afectan a la permeabilidad del principio activo. Para determinar la velocidad de absorción, y con ese valor la P_{app} , se obtuvieron los valores de las pendientes de ambos segmentos identificados, de 10 - 60 min y de 70 - 120 min. La velocidad de absorción calculada para los dos segmentos, resultó ser mayor para la $HCT_{(750 \mu g)}$, debido a que este parámetro depende de la concentración del principio activo. En cambio, la P_{app} de los dos ensayos realizados, resultaron ser estadísticamente similares para ambos segmentos, lo cual sugiere que, cambios en la concentración, no afectarían al coeficiente de P_{app} de la HCT.

Por su parte, el perfil de permeabilidad de $HCT_{(NPs)}$, tiene un comportamiento lineal, durante todo el ensayo. Al comparar los perfiles de permeabilidad obtenidos para $HCT_{(NPs)}$ y $HCT_{(50 \mu g)}$, se encontró que ambos perfiles tienen pendientes estadísticamente similares durante los primeros 60 min. Después de los 70 min, el flujo es significativamente mayor para $HCT_{(50 \mu g)}$ comparado con el de $HCT_{(NPs)}$. Esto afecta del mismo modo al coeficiente de P_{app} , los cuales tienen valores similares en la primera porción del perfil y diferentes en la segunda. Cabe destacar que, el coeficiente de P_{app} para el caso de los estudios realizados con las NPs, es un valor estimado, ya que la concentración que se utiliza para calcularlo se determina al finalizar el estudio de permeabilidad y se asume que se mantuvo constante durante todo el ensayo. Lo observado, indica que existe un comportamiento diferente del fármaco cuando éste se encuentra en solución o encapsulado.

El análisis de los perfiles de permeabilidad obtenidos para $HCT_{(750 \mu g)}$ y $HCT_{(NPs)}$, es similar al realizado con $HCT_{(50 \mu g)}$. En cuanto a la velocidad de absorción, ésta fue significativamente menor, con un valor de dos órdenes de magnitud inferior, para el caso de los estudios realizados con las NPs comparada con las velocidades de absorción obtenidas en los dos segmentos del perfil de

permeabilidad del fármaco solo. Si se considera, que se administraron cantidades iniciales similares de HCT en los ensayos realizados, (es decir, que la cantidad de HCT encapsulada en las NPs era equivalente a la que se utilizó en los ensayos con el fármaco solo en solución), este resultado indicaría que las NPs actuaron como un sistema de reservorio, liberando lentamente el principio activo hacia la solución mucosal. En cuanto al valor de la P_{app} , sin olvidar que es un valor estimado para el caso de $HCT_{(NPs)}$, se obtuvieron valores similares cuando se comparó este coeficiente con el obtenido para el primer segmento del perfil de permeabilidad de $HCT_{(750\ \mu g)}$, mientras que fueron diferentes comparado con el segundo segmento del mismo perfil. Todos estos datos, se analizaron estadísticamente con un test de ANOVA.

Estos ensayos, además de brindar información acerca de la permeabilidad del principio activo, postulan que la liberación del fármaco desde el sistema nanoparticulado ocurriría debido a que el CHI podría degradarse por acción de enzimas presentes en el intestino o, por una desestabilización de las NPs debido a una interacción con la mucina presente en el mucus que recubre el epitelio intestinal; razón por la cual no se observó liberación de la HCT cuando se realizaron los estudios de diálisis en soluciones tamponadas.

Los ensayos de permeabilidad realizados, requirieron de la evaluación de la integridad y funcionamiento del tejido intestinal; por lo cual se determinó simultáneamente, la capacidad de concentración de glucosa en forma activa de los segmentos intestinales aislados en medio de cultivo TC199. En el caso de los ensayos realizados con $HCT_{(NPs)}$, se observó que durante los 120 min que duró el ensayo, se concentró continuamente la glucosa, evidenciando así la viabilidad del tejido. Mientras que, en el caso de los estudios realizados con la HCT en solución, esta capacidad de concentración de glucosa, no se mantuvo constante; aunque el tejido permaneció visualmente íntegro. A partir de los 60 min, se evidenció una disminución en la capacidad de concentrar glucosa, lo cual sugirió que el tejido estaba dañado.

En base a los resultados de los estudios de viabilidad y las diferencias evidenciadas en cuanto a la permeabilidad del principio activo; se realizaron estudios de toxicidad intestinal, para determinar si había cambios a nivel histológico que explicaran los eventos observados.

Se han publicado algunos reportes de casos considerando la toxicidad de la HCT en humanos en diferentes órganos (Ribeiro y col., 2013; Westendorp y col., 2009). Los experimentos, en el presente estudio, tuvieron por objeto ofrecer nuevos datos para una mejor comprensión de la toxicidad de la HCT en humanos, especialmente considerando su efecto sobre la permeabilidad intestinal.

Estos estudios de toxicidad, se llevaron a cabo con muestras de intestinos de ratas tratados con HCT_(750 µg) y HCT_(NPs), las cuales estaban cargadas con una cantidad equivalente a (350 ± 130) µg de HCT. Se utilizaron dos técnicas de microscopía, MOAR y TEM, y por ambas se evidenciaron cambios muy notorios e interesantes con respecto a la muestra control (tejido intestinal sin tratamiento).

En las imágenes por MOAR de las muestras de los tejidos intestinales control, se identificaron vellosidades cubiertas por células epiteliales y microvellosidades, respetando un patrón normal del tejido. Las imágenes por TEM mostraron una morfología normal, observándose núcleos grandes e irregulares con un nucléolo bien definido, numerosas mitocondrias con sus respectivas crestas mitocondriales y uniones celulares bien definidas, que indican una buena adherencia célula a célula.

Los estudios de permeabilidad revelaron que el tejido intestinal, tratado con 750 µg de HCT sola, mostró una permeabilidad dependiente del tiempo, ya que a tiempos de exposición del tejido menores a los 60 min la pendiente del perfil de absorción de la HCT es menor que la obtenida en la región del perfil a tiempos mayores a los 60 min del ensayo. El aumento en la permeabilidad de la HCT, luego de los 60 min, podría atribuirse al daño irreversible que sufrió el tejido intestinal, lo cual fue revelado por las imágenes de TEM obtenidas luego de finalizar el experimento de permeación. Las imágenes revelaron la desaparición total del epitelio que recubre las vellosidades, quedando simplemente el tejido conectivo, extensamente vascularizado. Estos daños son consistentes con la actividad de la HCT sobre la bomba Na⁺-K⁺ ATPasa (Kezdi y col., 1985), ubicada en la membrana basal de los enterocitos en el TGI, permitiendo la libre difusión de los iones en la célula, lo cual determina que luego de la interacción de la HCT con la bomba Na⁺-K⁺ ATPasa, se produce un aumento intracelular de la concentración de Na⁺, lo cual estimula la producción de anión superóxido y el

sostenido estrés oxidativo celular (Fernández y col., 2013). Esta cadena de eventos intracelulares dispara una secuencia de disfunción celular, con el impedimento de la actividad mitocondrial debido a un desequilibrio iónico, lo cual es una de las principales causas del daño mitocondrial y posteriormente, a la muerte celular. Estas observaciones se pueden correlacionar con las alteraciones en las mitocondrias y la pérdida de epitelio intestinal que se observó en las imágenes obtenidas por TEM de los tejidos intestinales luego de los estudios de permeación, realizados con 750 µg de HCT.

En cambio, en las muestras de tejido tratadas con las NPs, la pérdida del epitelio del tejido intestinal fue significativamente menor, aunque se observaron cambios importantes en las células intestinales. En general, la estructura celular se mantuvo similar a la del tejido control y se observó la presencia de células calciformes. Por otro lado, fue evidente la disminución en la cantidad de microvellosidades, se detectaron numerosas vacuolas presentes en el interior de las células y las mitocondrias presentaban una morfología redondeada con la desaparición de las crestas mitocondriales. Estos daños observados se podrían atribuir a la presencia de la HCT en el interior de la célula, lo cual provocó el estrés celular.

A pesar de los cambios ultraestructurales que la HCT induce en el tejido intestinal, se demostró que la formulación de HCT encapsulada en las NPs no afectó las estructuras de las uniones estrechas del tejido intestinal, ya que se pudo observar en las imágenes de TEM la presencia de las uniones estrechas con características similares a las mostradas por el tejido control. Además, de acuerdo a los resultados obtenidos con los estudios de permeabilidad, se determinó que la HCT es transportada a la sangre siguiendo una cinética lineal, lo que da una clara indicación de una marcada disminución en la citotoxicidad de este fármaco cuando el mismo es formulado en NPs.

Sumado a lo anterior, se comprobó que las NPs de HCT con CHI son mucoadhesivas. Durante la realización de los ensayos de permeabilidad intestinal se observó una gran cantidad de mucina en la solución mucosal; lo cual podría respaldar las teorías acerca del cambio estructural que sufre la mucina cuando está en contacto con sustancias mucoadhesivas, y los resultados que se observaron por SEM y DLS. Todos estos estudios coinciden en que se

establecen interacciones entre el CHI y la mucina presente en la capa de mucus que recubre al tejido intestinal.

Por todas las razones expuestas, es que la formulación de la HCT en las NPs podría ser una estrategia interesante para aumentar la retención de este fármaco en el TGI y prolongar el tiempo de contacto de las NPs con la mucosa intestinal, conduciendo a un nivel sostenido de HCT en el intestino, permitiendo mejorar su biodisponibilidad y mitigando el daño intestinal que produce este fármaco debido a que permite liberar en forma sostenida en el tiempo una menor concentración de HCT disponible para su absorción.

3.2.5 Conclusiones Parciales

En esta segunda parte del capítulo, se realizaron estudios biofarmacéuticos de las NPs cargadas con HCT/ β CD, evaluando las propiedades mucoadhesivas, la permeabilidad y toxicidad intestinal.

Se desarrolló un método bioanalítico para cuantificar la cantidad de principio activo permeado, utilizando la técnica de HPLC. La preparación de las muestras analíticas para el HPLC, requirió de la EFS de la HCT, siendo posteriormente evaporada a sequedad y resuspendida en MeOH:H₂O para su cuantificación. La metodología bioanalítica propuesta se validó en relación a la selectividad, linealidad, sensibilidad, recuperación, exactitud y precisión.

Se evaluó la viabilidad *ex vivo* del tejido intestinal durante los ensayos realizados, tanto con NPs como con el fármaco solo. Para ello, se determinó la capacidad de concentración de glucosa de los segmentos intestinales aislados en medio de cultivo TC199. Los resultados obtenidos demostraron que durante los ensayos realizados con NPs, se mantuvo constante la capacidad de concentración de la glucosa y por consiguiente, la viabilidad del tejido. En cambio, durante los ensayos llevados a cabo con HCT sola, se observó una disminución en la capacidad de concentrar glucosa a partir de los 60 min, sugiriendo este resultado, que el tejido estaba dañado.

El método validado fue exitosamente aplicado a la determinación de HCT en los ensayos de permeabilidad intestinal. Dichos estudios se llevaron a cabo

empleando soluciones mucosales conteniendo 750 μg y 50 μg de HCT; y *pellets* de NPs cargadas con HCT/ βCD . Se determinó la velocidad de absorción y el coeficiente de P_{app} , para cada formulación.

Los estudios de permeabilidad mostraron que los perfiles de absorción no fueron lineales cuando se evaluó el fármaco libre, por lo tanto fue necesario calcular la pendiente de cada segmento. Se demostró que distintas concentraciones de HCT no afectaron al coeficiente de P_{app} , ya que en todos los casos, estos coeficientes fueron estadísticamente similares. En cuanto a la comparación de los perfiles de permeabilidad obtenidos para el caso de HCT_(50 μg) y HCT_(NPs), se observó que no presentan diferencias estadísticamente significativas en los primeros 60 min, tanto para la velocidad de absorción como para la P_{app} . Posteriormente a los 60 min del estudio, el flujo aumenta para el caso de HCT_(50 μg) y por consiguiente la P_{app} . Si bien se administraron cantidades iniciales similares de HCT en los ensayos realizados con HCT sola y con las NPs, 750 y (350 \pm 130) μg , respectivamente; se observó un flujo significativamente menor, con un valor de dos órdenes de magnitud inferior, para el caso de los estudios realizados con NPs, lo cual indicaría que las NPs actuaron como un sistema de reservorio y que liberaron lentamente el principio activo.

Los segmentos intestinales, utilizados en los ensayos de permeabilidad, se analizaron por MOAR y TEM. Los estudio a nivel histológico de los tejidos intestinales, demostraron que el epitelio que recubre las vellosidades del intestino se dañó por acción de la HCT. Las NPs evidenciaron tener un efecto protector con respecto al epitelio intestinal, ya que la liberación lenta de la HCT retarda la pérdida de la integridad del epitelio del intestino. Esta evidencia, sustenta los resultados obtenidos con los ensayos de permeabilidad.

En cuanto a la mucoadhesividad, se demostró, por diferentes técnicas, que las NPs de quitosano tienen propiedades mucoadhesivas.

RESUMEN FINAL Y CONCLUSIONES GENERALES

Se desarrollaron nanopartículas poliméricas (NPs), con CHI y TPP, utilizando la técnica de gelación iónica. Las NPs obtenidas fueron ampliamente caracterizadas, encontrándose que las mismas tenían un tamaño promedio de 350 nm, con una morfología esférica y de superficie lisa. Fueron capaces de encapsular una cantidad equivalente a (350 ± 130) μg de HCT con el complejo de inclusión HCT/ βCD en cada *pellet* obtenido.

Se evaluaron las propiedades mucoadhesivas de las NPs con el método de la mucina, tanto por DLS como por SEM. Ambas técnicas evidenciaron que las NPs interactúan electrostáticamente con la mucina, demostrando así la mucoadhesión del sistema.

Se llevaron a cabo estudios de permeabilidad intestinal, con diferentes concentraciones de HCT en solución y con NPs cargadas con el complejo HCT/ βCD . Los estudios realizados solo con HCT, presentaron un perfil de permeabilidad no lineal, lo cual indicó que la permeabilidad del fármaco involucra procesos diferentes de permeación a lo largo del ensayo, que modifican la permeabilidad de este fármaco, lo cual hace que la velocidad de absorción no sea constante y por lo tanto el coeficiente de P_{app} , tampoco. Sin embargo, los coeficientes de P_{app} obtenidos, de los dos tramos de los perfiles de permeación, fueron estadísticamente similares para ambas cantidades de fármaco evaluadas (50 y 750 μg).

En cuanto a las NPs, se demostró que el sistema nanoparticulado actúa como un sistema de reservorio, ya que se observó una menor velocidad de absorción del fármaco, comparado con los estudios realizados con 750 μg de HCT; lo cual indicó que la HCT se libera lentamente del sistema nanoparticulado, quedando así disponible, para luego ser absorbido.

Los estudios de toxicidad, se realizaron a nivel histológico utilizando diferentes técnicas de microscopía como, MOAR y TEM. Las imágenes obtenidas, evidenciaron un gran daño a nivel epitelial causado por la HCT, en donde desapareció por completo el epitelio que recubría las vellosidades del intestino. Mientras que, en las imágenes obtenidas de los tejidos tratados con NPs, se encontró que este daño fue menor, observando zonas en donde el

intestino se mantuvo intacto y en otras en donde fue dañado, a causa de la presencia del fármaco. Se atribuyó este retardo en el daño, a la lenta liberación del principio activo desde las NPs.

Como conclusión general de este capítulo, se puede afirmar que se logró sintetizar NPs con un tamaño adecuado para encapsular principios activos, con propiedades mucoadhesivas, capaces de actuar como un sistema de reservorio, debido a que producen una liberación lenta y controlada del principio activo.

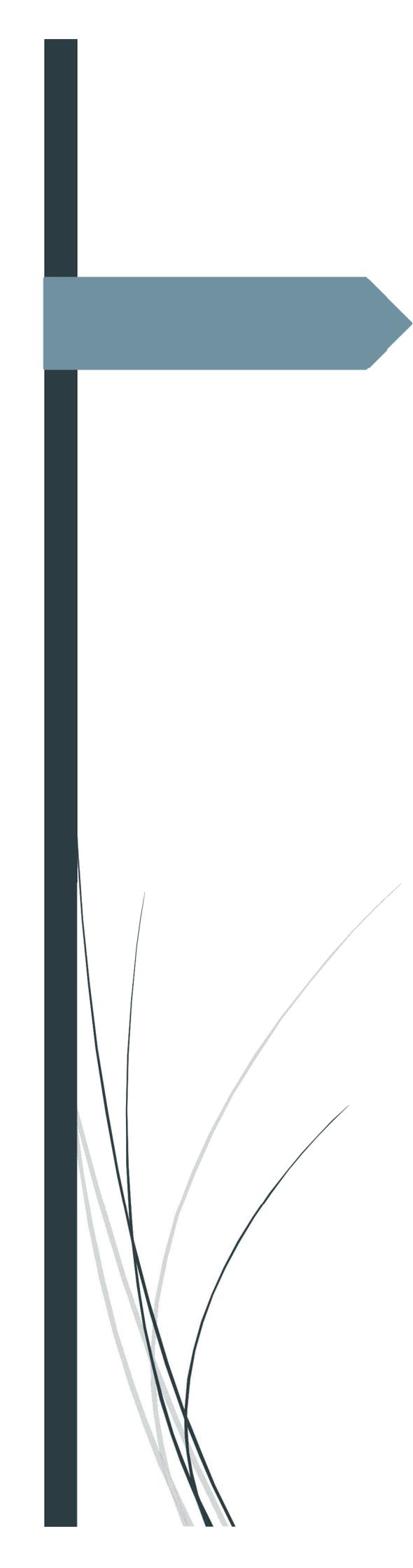
BIBLIOGRAFIA (en orden alfabético)

- Agüeros, M., Areses, P., Campanero, M. A., Salman, H., Quincoces, G., Peñuelas, I., & Irache, J. M. (2009). Bioadhesive properties and biodistribution of cyclodextrin-poly(anhydride) nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3-4), 231–240.
- Azizi, A. (2015). Engineering Science and Technology , an International Journal Investigating the controllable factors in influencing the weight loss of grinding ball using SEM / EDX analysis and RSM model, 18, 278–285.
- Calvo, P., & Remunan-Lopez, C. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied*, 125–132.
- Familiari, G., Relucenti, M., Familiari, a, Battaglione, E., Franchitto, G., & Heyn, R. (2007). Visualization of the real microarchitecture of glycoprotein matrices with scanning electron microscopy Conventional SEM analysis, 224–228.
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90(1), 21–27.
- FDA, F. and D. A., & Food and Drug Administration. (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. In *U.S. Department of Health and Human Services* (Department, p. 34). Rockville (MD).
- Fernández, D. a., Louzao, M. C., Vilariño, N., Espiña, B., Fraga, M., Vieytes, M. R., ... Botana, L. M. (2013). The kinetic, mechanistic and cytomorphological effects of palytoxin in human intestinal cells (Caco-2) explain its lower-than-parenteral oral toxicity. *FEBS Journal*, 280(16), 3906–3919.
- Fontestad, C. N., Álvarez, I. G., Casabó, V., Merino, V., & Bermejo, M. (2008). Correlación entre modelos in vitro, in situ e in vivo en estudios de absorción. *Revista Médicas Uis*, 21(1). Retrieved from
- Gésime JM, Acevedo AM, Lalaguna F. (2009). Las mucinas salivales y sus implicancias en la reología de la saliva humana y los sustitutos salivales. *Acta Odontológica Venezolana*, 47(2), 1–12.

- Gómez-gaete, C. (2014). NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS: TECNOLOGÍA Y APLICACIONES FARMACÉUTICAS (Polymeric nanoparticles: technologie and pharmaceutical applications). *Revista Farmacologica de Chile*, 7(2), 7–16.
- Goycoolea, F. M., C, R.-L., & Alonso, M. J. (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. In M. de la R. A. N. de Farmacia (Ed.), *Nanotecnología Farmacéutica* (pp. 103–131). Madrid: Vila, J.L. ed.
- Grießinger, J., Dünnhaupt, S., Cattoz, B., Griffiths, P., Oh, S., Gómez, S. B. I., ... Bernkop-Schnürch, A. (2015). Methods to determine the interactions of micro- and nanoparticles with mucus. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1–13.
- Grupta RB, K. U. (2006). *Nanoparticle Technology for Drug Delivery*. (R. Grupta & K. UB., Eds.). New York: Taylor and Francis Group.
- Gualdesi, M. (2013). *Estudios farmacéuticos y farmacocinéticos de nuevos carbonatos de lamivudina*. Facultad de Ciencias Químicas - UNC, Córdoba.
- Gualdesi, M. S., Briñón, M. C., & Quevedo, M. A. (2012). European Journal of Pharmaceutical Sciences Intestinal permeability of lamivudine (3TC) and two novel 3TC prodrugs . Experimental and theoretical analyses, 47, 965–978.
- ICH. (2005). Validation of a analytical Procedures: text and methodology Q2(R1). *Guidance*, 1994(November 1996), 17.
- Irache, J. M. (2008). Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas. *Anales Sis San Navarra*, 31(1), 7 – 10.
- Joshi, S. a., Chavhan, S. S., & Sawant, K. K. (2010). Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles: Preparation, optimization, characterization, in vitro and pharmacodynamic studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76(2), 189–199.
- Kezdi P, Danopoulos D, Stanley EL, M. M. (1985). Mechanism of diuretic-induced hypotassemia in human hypertension. *Klinische Wochenschrift*, 63(3), 125–128.
- Krauland, A. H., & Alonso, M. J. (2007). Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 340(1-2), 134–142.

- Lancheros, R. J., Beleño, J. Á., Guerrero, C. A., & Godoy-Silva, R. D. (2014). Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC). *Universitas Scientiarum*, 19(2), 161–168.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Ballent, M., Sallovitz, J., & Lanusse, C. (2009). Combined use of ivermectin and triclabendazole in sheep: In vitro and in vivo characterisation of their pharmacological interaction. *Veterinary Journal*, 182(2), 261–268.
- Luis, T., & Gladis, A. (1996). Histología normal del intestino delgado. *Rev. Med. Hered*, 7, 46–57.
- Mora MJ. (2013). *Estudios de absorción oral de acetazolamida y de sus complejos con ciclodextrinas y etanolamina*. Facultad de Ciencias Químicas - UNC, Córdoba.
- Oh, S., Wilcox, M., Pearson, J. P., & Borrós, S. (2015). Optimal design for studying mucoadhesive polymers interaction with gastric mucin using a quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D): Comparison of two different mucin origins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (August), 1–7.
- Onnainty, R., Schenfeld, E. M., Quevedo, M. a, Fernandez, M. a, Longhi, M. R., & Granero, G. E. (2013). Characterization of the Hydrochlorothiazide: beta-Cyclodextrin Inclusion Complex. Experimental and Theoretical Methods. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(1), 206–217.
- Quattrocchi, O. A., Abelaira de Adrizzi, S., & Laba, R. F. (1992). Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica.
- Quevedo, M. a, Nieto, L. E., & Briñón, M. C. (2011). P-glycoprotein limits the absorption of the anti-HIV drug zidovudine through rat intestinal segments. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 43(3), 151–9.
- Quevedo, M. A., & Briñón, M. C. (2009). In vitro and in vivo pharmacokinetic characterization of two novel prodrugs of zidovudine. *Antiviral Research*, 83(2), 103–111.
- Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., & Cesàro, A. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1-2), 219–228.
- Renau-piqueras, J., & Faura, M. (1965). Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido. *Centro de Investigación Hospital "La Fé,"* 73–92.

- Ribeiro, M. C. P., Avila, D. S., Schiar, V. P. P., Santos, D. B. Dos, Meinerz, D. F., Duarte, M. M. F., Rocha, J. B. T. (2013). Diphenyl diselenide supplementation reduces biochemical alterations associated with oxidative stress in rats fed with fructose and hydrochlorothiazide. *Chemico-Biological Interactions*, 204(3), 191–9.
- Ross, M., & Pawlina, W. (2008). *Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular*. (5th ed.). Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.
- Sriamornsak, P., Wattanakorn, N., & Takeuchi, H. (2010). Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 54–59.
- Westendorp, B., Hamming, I., Szymanski, M. K., Navis, G., van Goor, H., Buikema, H., Schoemaker, R. G. (2009). Adverse renal effects of hydrochlorothiazide in rats with myocardial infarction treated with an ACE inhibitor. *Eur J Pharmacol*, 602(2-3), 373–379.
- Znamenskaya, Y., Sotres, J., Engblom, J., Arnebrant, T., & Kocherbitov, V. (2012). Effect of hydration on structural and thermodynamic properties of pig gastric and bovine submaxillary gland mucins. *Journal of Physical Chemistry B*, 116, 5047–5055.



Desarrollo y Caracterización de Bionanocompuestos

Capítulo 4

Farm. Renée Onnainty
TESIS DOCTORAL

Capítulo 4:

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE BIONANOCOMPUESTOS

INTRODUCCIÓN

Uno de los temas actuales en la investigación médica, es el desarrollo de materiales antibacterianos adecuados que podrían utilizarse en el futuro para fines médicos. Existe un particular interés en las sustancias que actúan como transportadores antibacterianos o agentes antimicóticos para tratamientos locales, como son las infecciones en la cavidad oral, evitando de esta manera el tratamiento a nivel de todo el organismo en la primera fase de la terapia (Holešová y col., 2013).

La investigación y el desarrollo de sistemas de administración de fármacos bioadhesivos tienen un particular atractivo, debido a que su principal objetivo es lograr la localización del sistema de administración de fármacos en una región determinada del organismo, aumentar el tiempo de permanencia del fármaco en dicha región y optimizar la absorción del principio activo, por medio de una mejora sustancial en el contacto del fármaco disuelto con la mucosa a través de la cual se lleva a cabo el fenómeno de absorción.

Las principales ventajas que presentan las formas farmacéuticas mucoadhesivas y que apoyan su creciente interés son (Rodríguez y col., 2000):

- Las diversas y abundantes vías de administración desde donde pueden obtenerse efectos terapéuticos sistémicos y/o localizados.
- Los lugares potencialmente disponibles para la aplicación de los sistemas mucoadhesivos, debido a la presencia de una capa de mucus que cubre el epitelio, incluyendo las cavidades gastrointestinal, rectal y bucal, la nariz, vías respiratorias, el ojo y la zona vaginal.
- Las diversas formas farmacéuticas en las cuales es posible administrar el principio activo, como por ejemplo, geles, *pellets*, comprimidos.

Teniendo en cuenta las ventajas de la administración local y lo interesante que son los sistemas mucoadhesivos, uno de los objetivos planteados en este trabajo de tesis fue la obtención de un bionanocompuesto, de potencial aplicación tópica destinado a su administración bucal.

➤ **Mucosa oral**

La mucosa oral representa un sitio de administración de fármacos de gran interés ya que ofrece ventajas sobre las formas farmacéuticas inyectables y orales. Este sitio tiene una alta vascularización, los fármacos absorbidos a través de la mucosa oral pueden entrar directamente a la circulación sistémica evitando su pasaje a través del tractogastrointestinal (TGI) y el metabolismo de primer paso hepático (Perioli y col., 2013).

La cavidad oral presenta cuatro regiones disponibles para una efectiva administración de fármacos, las cuales son la bucal, la sublingual, la palatal y la gingival. Los sectores bucal y sublingual son los más apropiados para la liberación de fármacos y son utilizados para tratamientos de enfermedades locales y sistémicas. La mucosa sublingual es más permeable y fina que la mucosa oral; se utiliza cuando se desean efectos rápidos, ya que tiene mayor superficie y alto flujo sanguíneo. Por su parte, la mucosa oral ofrece otras ventajas, como su superficie lisa y prácticamente inmóvil, la cual es apta para administrar sistemas de liberación controlados (Scholz y col., 2008).

Una de las ventajas de la vía de administración bucal es que las formas farmacéuticas pueden ser fácilmente administradas y podrían ser rápidamente removidas si fuera requerido. De todos modos, existen una serie de factores que podrían limitar la absorción de los principios activos a través de la mucosa oral, como por ejemplo: la exposición al flujo salivar, la pequeña área de absorción, la producción de fuerzas cortantes debido a los movimientos de la lengua, la deglución y también un corto tiempo de residencia.

Desde 1980 existe un gran interés orientado en realizar formulaciones bucales utilizando polímeros mucoadhesivos; en efecto estos sistemas pueden ofrecer numerosas ventajas con respecto a las formas de dosificación sólidas no adhesivas. Como ejemplos se podrían mencionar, la proximidad entre la mucosa

y la forma de dosificación, el mantenimiento de una alta concentración del fármaco en la superficie de absorción por un período de tiempo prolongado y la inmovilización de la forma de dosificación en una parte específica de la mucosa oral (Perioli y col., 2013).

Teniendo en cuenta las características especiales de la mucosa de la cavidad oral, las propiedades requeridas para un sistema de liberación de fármacos en dicha cavidad incluyen: biocompatibilidad, mucoadhesividad, estabilidad, no inmunogenicidad y capacidad para sostener la liberación de fármacos, lo cual permite mantener los niveles terapéuticos de los mismos en un período extendido de tiempo (Aduba y col., 2013). Un sistema de liberación bucal ideal debería adherirse a la mucosa oral rápidamente y con suficiente estabilidad para alcanzar un tratamiento efectivo (Sudhakar y col., 2006).

➤ **Bionanocompuestos**

En la última década, ha crecido el interés en el desarrollo de nanocompuestos, entre arcillas minerales y biopolímeros, para aplicaciones farmacéuticas. Estos materiales híbridos pueden combinar las propiedades de ambos componentes (orgánicos e inorgánicos), tales como el hinchamiento, la recaptación de agua, las características mecánicas, el comportamiento térmico, la reología y la bioadhesión. Entre estos nanocompuestos, que pueden estar formados por una gran variedad de biopolímeros y arcillas, se destacan los formados por montmorillonita (MMT) y quitosano (CHI), los cuales han recibido una gran atención, especialmente para aplicaciones biomédicas (ingeniería de tejidos) y biofarmacéuticas (liberación modificada de fármacos).

➤ **Quitosano**

El CHI ya ha sido ampliamente descrito en el capítulo 1 de este trabajo de tesis. Como característica general del CHI se puede mencionar que es un biopolímero biológicamente seguro. Debido a sus propiedades bioadhesivas, se ha propuesto para conferirle esta propiedad al nanocompuesto, que tiene como

finalidad utilizarse como sistema de liberación controlada de fármacos en la mucosa oral.

➤ Montmorillonita

La MMT, fue descrita detalladamente en el capítulo 1 de la presente tesis. Simplemente cabe destacar que es un silicato de aluminio laminar hidratado, en el cual la celda unidad está compuesta por una lámina octaédrica de aluminio (O), entre dos láminas tetraédricas de silicato (T). Posee una carga neta negativa debido a la sustitución iónica en la estructura T – O – T, la cual está compensada por cationes hidratados ubicados en el espacio de la interlámina, que posibilita el intercambio por una gran variedad de moléculas orgánicas (Salcedo y col., 2012).

➤ Clorhexidina

La clorhexidina, figura 4.1, se comercializa como digluconato de clorhexidina, clorhidrato de clorhexidina ó acetato de clorhexidina. En el desarrollo de esta tesis doctoral se trabajó con el digluconato de clorhexidina, la cual se denomina genéricamente CLX.

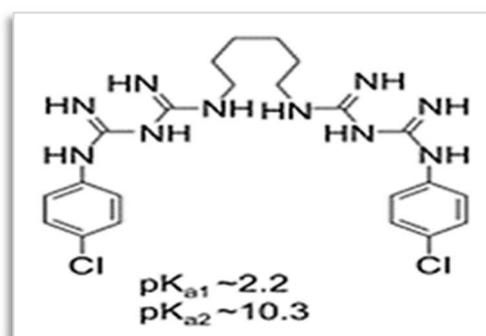


Figura 4.1: Clorhexidina.

Este principio activo es un agente antimicrobiano perteneciente al grupo de las bisguanidinas. Esta molécula es soluble en agua y en alcohol, lo cual aumenta su efectividad.

La CLX tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, también es efectiva frente a algunos hongos y levaduras, incluyendo *Cándida*, y algunos virus lipofílicos, como HIV y HVB (Kolahi y col., 2011). Exhibe un efecto bactericida inmediato y tiene un excelente poder residual, el cual previene el restablecimiento de microorganismos en la piel. El mecanismo de acción de este principio activo es por medio de la disrupción de la pared celular y precipitación de las proteínas celulares de los microorganismos. Ejerce su actividad antimicrobiana debido a que se encuentra cargada positivamente a pH fisiológico.

La CLX tiene diversos usos, todos ellos en forma tópica. En odontología se emplea como agente antiplaquetario y en el tratamiento de la gingivitis (Nhung y col., 2007), en forma de geles y enjuagues bucales. Además, se la emplea en solución para preparar superficies antisépticas, para su desinfección y preservación. Debido a que es un agente antibacteriano de amplio espectro, se la considera el antiséptico más aceptable para reducir las infecciones de transmisión nosocomial, en unidades de controles intensivos (Huynh y col., 2010).

La clorhexidina se absorbe muy poco en la piel y las mucosas, por lo cual su toxicidad sistémica asociada es baja.

➤ Objetivos

El principal objetivo de esta etapa del trabajo de tesis, fue desarrollar un bionanocompuesto combinando MMT y CHI, con el fin de obtener un sistema de liberación modificada para la administración de fármacos de aplicación bucal.

Para cumplir con dicho objetivo, se trabajó con la CLX, como fármaco modelo, la cual es un antiséptico local ampliamente utilizado en la actualidad.

La metodología de trabajo empleada se describe a continuación:

- Optimización de la técnica para la obtención del bionanocompuesto, $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CHI}$.
- Obtención del nanocompuesto con el principio activo de interés: sistema binario, $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CLX}$ y sistema ternario, $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CHI}/\text{CLX}$.

- Caracterización fisicoquímica de los sistemas obtenidos (Na⁺MMT/CHI, Na⁺MMT/CHI/CLX y Na⁺MMT/CLX), utilizando diversas técnicas en el estado sólido: análisis térmico (DSC/TGA), espectroscopía de difracción de rayos X (XRD), espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

El desarrollo y caracterización de los bionanocompuestos, se realizó en colaboración con el Prof. Antonello Barresi y la Prof. Bárbara Onida, en el departamento de Ciencia Aplicada y Tecnología (DISAT), Politécnico de Torino; Torino, Italia; durante una estadía de 6 meses en el marco de una beca Erasmus Mundus, Euro Tango 2; octubre 2012 – abril 2013.

- Realización de estudios de liberación *in vitro* utilizando la técnica de diálisis con membranas de celulosa, para determinar el mecanismo de liberación del fármaco a valores de pH fisiológicos simulados.
- Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sistemas Na⁺MMT/CHI, Na⁺MMT/CHI/CLX, Na⁺MMT/CLX frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Evaluación de las propiedades mucoadhesivas de los sistemas obtenidos frente a mucina, utilizando la técnica de SEM.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Materiales

La CLX, fue provista por Todo Droga (Córdoba, Argentina) y se utilizó sin previa purificación.

El CHI de bajo peso molecular, la MMT y la mucina gástrica de cerdo se adquirieron en Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina).

Las membranas de celulosa para las diálisis (cut-off 14000, 43 mm de ancho) se compraron en Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina).

Todos los experimentos se realizaron con reactivos de grado analítico.

El agua utilizada en todos los estudios fue producida con un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

4.2 Instrumental

Las muestras se pesaron en una balanza analítica Voyager Ohaus modelo Explorer E01140 y se solubilizaron con la ayuda de un ultrasonicador Elma S 40 Elmasonic.

El pH se determinó utilizando un pH-metro Hanna instrument HI 255 combined meter.

Las muestras se prepararon utilizando un agitador orbital con control de temperatura, Ferca, Industria Argentina.

Las mediciones de la absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis. Se emplearon celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico Hèllma Analytics.

Los análisis térmicos se realizaron utilizando un equipo DSC Q200 TA Series y un TGA Mettler; la caracterización en cuanto a la composición química de las muestras se llevó a cabo con un espectrómetro de fluorescencia de rayos X Rigaku ZSX; y los espectros de difracción rayos X se obtuvieron usando un equipo Panalytical X'Pert PRO (Cu K_α radiation) diffractometer.

Las imágenes de los sistemas en estudio para el análisis en cuanto a su morfología, fueron obtenidas con un microscopio electrónico de barrido (SEM) SUPRA™ 40 (ZEISS), y los estudios de mucoadhesión fueron realizados utilizando FE-SEM Sigma, Lamarx.

Los espectros infrarrojos fueron obtenidos con un espectrómetro 5 SXC Nicolet FT-IR.

4.3 Métodos

4.3.1 Obtención de los Bionanocompuestos

Los bionanocompuestos fueron obtenidos a partir de MMT sódica (Na⁺MMT), para lo cual la MMT comercial fue tratada previamente con una solución de NaNO₃ 1 M. Se pesó 1 g de MMT y se dispersó en 50 mL de NaNO₃ 1M; la suspensión se mantuvo con agitación constante por 24 h a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 2 ciclos de centrifugado para eliminar el exceso de NaNO₃ y lavar la muestra. Posteriormente, se liofilizó para obtener el compuesto sólido.

Los nanocompuestos se obtuvieron aplicando el siguiente protocolo de trabajo: se disolvieron 2 g de CHI de bajo peso molecular en 100 mL de una solución al 2% v/v de ácido acético, el pH de la solución se ajustó a 4,9 con una solución de NaOH 1M, con el fin de evitar cualquier cambio estructural en la arcilla¹ cuando ambas soluciones se ponen en contacto. Se pesaron 1,28 g de arcilla y se dispersaron en 50 mL de agua Milli Q; la suspensión se colocó en un baño ultrasónico por 1 h. Luego, se agregó lentamente la solución de CHI a la suspensión de la arcilla, la cual se mantuvo con agitación magnética. Se colocó el sistema en un agitador orbital, con movimientos lentos a 60 °C por 24 h. El sistema arcilla/CHI se lavó cuatro veces con agua destilada realizando ciclos de centrifugación a 3500 rpm durante 10 min. Finalmente, se obtuvieron los

¹ En el protocolo para obtener el nanocompuesto se denomina arcilla, de manera general para hacer referencia tanto a la MMT comercial como a la Na⁺MMT.

nanocompuestos sólidos por liofilización. Este protocolo de trabajo fue adaptado de uno reportado en bibliografía (Monvisade y col., 2009).

Para obtener el sistema cargado con el principio activo, se dispersaron 0,5 g de Na⁺MMT/CHI o Na⁺MMT, en 10 mL de una solución acuosa de CLX 0,22 M. La dispersión formada se mantuvo con agitación magnética constante durante 24 h, a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min para poder separar el exceso de fármaco. Después de congelar las muestras, se liofilizaron para obtener el nanocompuesto sólido cargado con CLX.

4.3.2 Eficiencia de Asociación y de Carga de la CLX

La eficiencia de asociación de la CLX en los nanocompuestos indica el porcentaje de principio activo que es incorporado al sistema, el cual se determinó utilizando un método indirecto, basado en cuantificar la cantidad de fármaco presente en el sobrenadante luego de centrifugar y restarlo a la cantidad inicial conocida de fármaco (ecuación 4.1). También se calculó la eficiencia de cargado aplicando la ecuación 4.2, la cual relaciona los gramos de sistema recuperados en estado sólido con la cantidad de fármaco allí incorporado (Krauland y col., 2007).

La CLX presente en el sobrenadante se cuantificó utilizando un método espectrofotométrico UV-Vis, a una longitud de onda máxima seleccionada de 255 nm.

$$\text{Eficiencia de asociación} = \frac{CLX_{\text{inicial}} - CLX_{\text{libre}}}{CLX_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4.1}$$

$$\text{Eficiencia de cargado} = \frac{\text{mg CLX}_{\text{total}} - \text{mg CLX}_{\text{libre}}}{\text{Peso total del sistema}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4.2}$$

4.3.3 Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X

La composición química de cada muestra se obtuvo utilizando la técnica de espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF). Se analizaron la MMT, la MMT/CHI, la Na⁺MMT y la Na⁺MMT/CHI.

Las muestras se colocaron en el espectrómetro, en forma de discos, para la cual fue muy importante que la pastilla estuviera perfectamente compactada y que la superficie fuera lisa. Las pastillas de las muestras se realizaron sin el agregado de ningún otro componente.

Los resultados obtenidos fueron analizados con el software del equipo Rigaku. Los mismos se expresan como el porcentaje de cada componente en forma de óxido, relativos a la muestra.

4.3.4 Espectroscopía Infrarroja

Se obtuvieron los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) de muestras liofilizadas de cada uno de los componentes puros Na⁺MMT, CHI y CLX; y de los sistemas Na⁺MMT/CHI, Na⁺MMT/CLX y Na⁺MMT/CHI/CLX. Las muestras se prepararon en pastillas de KBr diluidas al 1%, se escanearon en el rango de 4000-450 cm⁻¹, con una resolución de 4 cm⁻¹ y con escaneos de 64 veces por muestra.

4.3.5 Espectroscopía de Rayos X

Los patrones de difracción de rayos X (XRD) se obtuvieron utilizando una fuente de radiación monocromática de Cu K_α (1,54 Å), con un detector PIXcel de estado sólido con tiempo de lectura rápida y de alto rango dinámico, operado a 40 kV y a una corriente de 30 mA con una velocidad de exploración de 0,02° 2θ/paso a temperatura ambiente. Dichos patrones de difracción fueron grabados desde 5° a 80° con una escala de scans de 10° s⁻¹. Se analizaron muestras liofilizadas de los componentes puros CHI, Na⁺MMT, CLX y de los sistemas Na⁺MMT/CHI, Na⁺MMT/CLX y Na⁺MMT/CHI/CLX.

Los espectros fueron analizados utilizando el software propio del equipo Philip X'pert PRO.

4.3.6 Análisis Térmico: Calorimetría Diferencial de Barrido y Análisis Termogravimétrico.

Los estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) se realizaron con 10 – 15 mg de muestra, en pans herméticos. Se llevaron a cabo con atmósfera controlada de nitrógeno (N₂) y con una rampa de calentamiento de 10 °C/min, comenzando a temperatura ambiente hasta un máximo de 250 °C.

Los Análisis Termogravimétricos (TGA) se realizaron en pans no herméticos, con 20 – 35 mg de muestra. Se hicieron con atmósfera controlada de nitrógeno (N₂) y una con rampa de calentamiento de 10°C/min hasta un máximo de 900°C.

Por ambas técnicas se analizaron muestras de Na⁺MMT, CHI, CLX, Na⁺MMT/CHI, Na⁺MMT/CLX y Na⁺MMT/CHI/CLX.

Los datos de DSC obtenidos se analizaron utilizando el software del equipo TA Instrument Universal Análisis 2000 y los datos de TGA fueron procesados utilizando el programa de cálculo Excel, Microsoft.

4.3.7 Microscopía Electrónica de Barrido

4.3.7.1 Morfología

La morfología del sistema fue estudiada por SEM, analizando muestras en estado sólido de Na⁺MMT y Na⁺MMT/CHI. Los polvos de los sistemas liofilizados se dispersaron cuidadosamente sobre un soporte, recubierto por una lámina con pegamento de doble contacto. Las muestras se analizaron sin recubrimiento metálico.

4.3.7.2 Estudios de Mucoadhesión

Se preparó una suspensión de mucina gástrica porcina (MUC) de concentración 0,1 mg/mL, y una suspensión de Na⁺MMT y otra de Na⁺MMT/CHI/CLX, de 10 mg/mL cada una, todas ellas en una solución tamponada de fosfatos pH 7,4 (0,1 M). Se colocaron 3 mL de la solución de MUC

y 1 mL de la solución del nanocompuesto en un vaso de precipitados. Las suspensiones se dejaron equilibrar por 24 h a temperatura ambiente, con agitación constante.

Las muestras estudiadas fueron MUC, MUC:Na⁺MMT y MUC:Na⁺MMT/CHI/CLX, las cuales se prepararon colocando una gota de la suspensión obtenida, teniendo precaución de que no sedimente la arcilla, sobre el soporte del SEM. Las muestras se secaron en una cámara de vacío hasta corroborar la ausencia de agua, pero sin estar deshidratadas. Luego se recubrieron con oro y se analizaron con el microscopio electrónico.

4.3.8 Estudios de Liberación *in vitro*

Los estudios de liberación *in vitro* fueron realizados utilizando la técnica de diálisis en tubos de membrana de celulosa (Joshi y col., 2010).

Los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, en soluciones de diferentes valores de pH: HCl 0,1 M (pH 1,2) y soluciones tamponadas de ácido acético: acetato de sodio (55:45) pH 4,2 y 6,8, simulando el pH fisiológico de la mucosa oral. En cada ensayo el medio donador fue igual al medio receptor, utilizándose en ambos casos la misma solución tamponada. Las muestras evaluadas fueron CLX, Na⁺MMT/CLX y Na⁺MMT/CHI/CLX.

Los ensayos se realizaron con 50 mg de CLX o con una cantidad equivalente a la CLX pura en los nanocompuestos obtenidos. Las muestras se resuspendieron con 5 mL de medio donador y se colocaron dentro del saco de la membrana de celulosa sellado herméticamente (compartimento donador). La membrana se hidrató con medio donador durante 2 h previas al comienzo del ensayo. Finalmente, la bolsa de diálisis se sumergió en 200 mL de medio receptor y se mantuvo con agitación constante, a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de 5 mL cada una, con reposición de medio fresco, a intervalos de tiempos determinados por 24 h. La cantidad de principio activo presente en las muestras se cuantificó utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a una $\lambda = 255$ nm. Cada ensayo se realizó por triplicado.

La cantidad de CLX liberada se expresó en porcentaje, considerando el 100% a la cantidad inicial de principio activo colocado en la bolsa de diálisis.

Para analizar la cinética de los datos se utilizó el modelo de Korsmeyer - Peppas (Korsmeyer y col., 1983), el cual está basado en la ley de Fick. Este modelo es útil para predecir el mecanismo de liberación teniendo en cuenta las primeras horas del ensayo, en donde el perfil de la liberación es lineal (ecuación 4.3) (Jose y col., 2013).

$$M_t/M_\infty = K \times t^n \quad \text{Ecuación 4.3}$$

Para despejar el valor n se trabajó con la forma logarítmica de la ecuación 4.3 de acuerdo a la siguiente expresión, ecuación 4.4:

$$\log \frac{M_t}{M_\infty} = \log K + n \log t \quad \text{Ecuación 4.4}$$

en donde, M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberado a tiempo t , K es una constante, n es el exponente de difusión y t es el tiempo de liberación. De acuerdo con este modelo, el valor de n obtenido de la pendiente, que surge de graficar el logaritmo de la fracción de fármaco liberado en función del logaritmo del tiempo, permite suponer el mecanismo de liberación del fármaco.

4.3.9 Estudios Microbiológicos *in vitro*

La actividad antibacteriana se evaluó *in vitro* utilizando la técnica de discos de difusión en placas de Petri, frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, utilizando como referencia la cepa ATCC 25923, y como cepas clínicas a 235, 787, 2127, 2804, 2387, 123, 43300.

Se esterilizaron placas de Petri de 90 mm de diámetro, conteniendo 15 mL del medio de cultivo agar Mueller – Hinton. Los cultivos de las cepas se prepararon en 10 mL de caldo Mueller – Hinton y se incubaron por 18 h. Transcurrido el tiempo previsto, los cultivos se agitaron con un vortex y se prepararon diluciones 1/10 en PBS, para luego sembrarse en la superficie de las placas de Petri e incubadas por 24 h.

Se impregnaron discos de papel de 8 mm de diámetro, previamente esterilizados, con 10 μL de una suspensión de 20 mg/mL en agua de cada una de las muestras a ensayar: CLX, $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CHI}$, $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CLX}$, $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CHI}/\text{CLX}$. Los discos se colocaron sobre las placas de agar sembradas y se incubaron a 37 °C por 24 h. Finalizado el ensayo, se midió el halo de inhibición, de un extremo al otro, incluyendo el diámetro del disco de papel. Mientras mayor es el halo de inhibición, mayor es la actividad antimicrobiana del compuesto. Los experimentos se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron en milímetros (mm).

Los ensayos microbiológicos se realizaron en colaboración con la Dra. Paulina Páez, investigadora de UNITEFA-CONICET, en el departamento de Farmacia, de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

4.3.10 Análisis Estadístico de los Datos

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el test- t de Student. En este test, se rechaza la hipótesis nula (H_0) cuando $p \leq 0$ al nivel de significación elegido. Es decir si se trabaja con un 95% de confianza, $p = 0,05$. H_0 plantea que no hay diferencia entre las muestras comparadas. Por lo tanto, se considera que una diferencia es estadísticamente significativa cuando se cumple que $p \leq 0,05$, siendo p la probabilidad.

4.4 Resultados y Discusión

4.4.1 Obtención de los Bionanocompuestos

Los bionanocompuestos se sintetizaron siguiendo la metodología de trabajo propuesta, obteniéndose la siguiente variedad de productos: MMT/CHI, Na^+MMT , $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CHI}$, $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CLX}$ y $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CHI}/\text{CLX}$.

Los sistemas fueron ampliamente caracterizados, utilizando diversas técnicas fisicoquímicas.

4.4.2 Eficiencia de Asociación y de Carga de la CLX

La cantidad de CLX incorporada a los nanocompuestos se determinó utilizando una curva de calibrado en un rango de concentraciones de $1,4 \times 10^{-5}$ M a 7×10^{-5} M en agua, a una $\lambda = 255$ nm. Los resultados del ajuste de la recta se muestran en la figura 4.2.

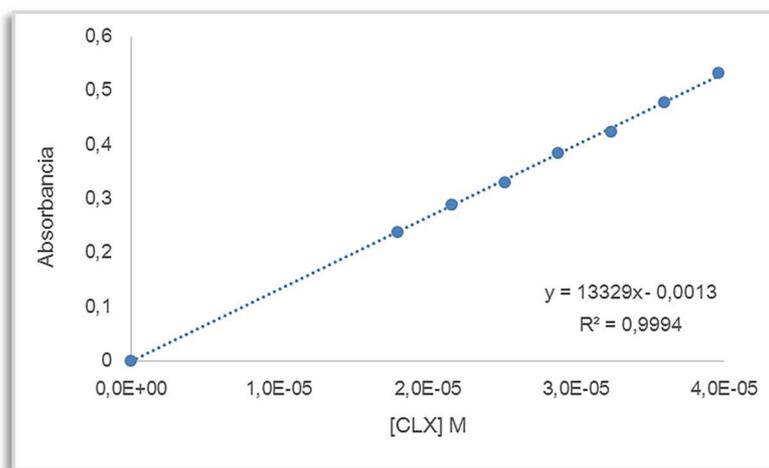


Figura 4.2: Curva de calibrado de CLX en agua, $\lambda = 255$ nm.

Se calculó la eficiencia de asociación y de cargado de la CLX en los sistemas, utilizando las ecuaciones 4.1 y 4.2. Los resultados indicaron que la Na^+MMT tuvo una eficiencia de asociación de CLX del $(19 \pm 2)\%$ y una eficiencia de carga de la CLX del $(34 \pm 3)\%$, mientras que los resultados correspondientes para el sistema $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CHI}$ fueron del $(15 \pm 2)\%$ y $(26 \pm 4)\%$, respectivamente.

Estos valores indicaron que la Na^+MMT incorporó en su estructura mayor cantidad de CLX en comparación al sistema $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CHI}$; lo cual podría deberse a una fuerte interacción electrostática existente entre las cargas negativas de la Na^+MMT con las cargas positivas de la CLX. La diferencia en los resultados, fue corroborada estadísticamente por medio del test de Student, ya que el valor de p calculado para la eficiencia de asociación fue de 0,0027 y de 0,00055 para la eficiencia de cargado, cumpliéndose en ambos casos $p < 0,05$. Los resultados se presentan en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Eficiencia de asociación y de cargado.

| Sistema | Na ⁺ MMT/CLX | Na ⁺ MMT/CHI/CLX | <i>p</i> |
|--|-------------------------|-----------------------------|----------|
| Eficiencia de asociación (%) (\pm DS) | 19 \pm 2 | 15 \pm 2 | 0,0027 |
| Eficiencia de cargado (%) (\pm DS) | 34 \pm 3 | 26 \pm 4 | 0,0005 |

4.4.3 Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X

En el análisis elemental por XRF, la muestra se irradia con rayos X de alta energía. Por la radiación se desalojan electrones de las capas internas de los átomos, siendo inmediatamente ocupadas las posiciones libres que dejan, por electrones de las capas externas. Estos electrones exteriores pasan así a un estado de menor energía, emitiéndose simultáneamente la energía liberada como radiación X de longitud de onda característica y típica de cada clase de átomo o elemento. La intensidad de esta radiación característica emitida, la cual se mide, es proporcional a las cantidades de los respectivos elementos presentes en la muestra que se analiza (Knöfel, 1983). Esta técnica es muy utilizada para el análisis elemental y análisis químico, particularmente en la investigación de metales, vidrios, cerámicos, materiales de construcción, etc.

Se utilizó la técnica de XRF para determinar la composición química de las muestras de MMT, Na⁺MMT, MMT/CHI y Na⁺MMT/CHI. En este estudio se utilizaron tanto, la arcilla en su estado puro, como la arcilla sódica, para poder comparar la composición de cada una de las muestras. Los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas se muestran en la tabla 4.2, en donde los elementos químicos se presentan en su forma de óxido.

En la muestra de Na⁺MMT se pudo observar claramente la presencia de sodio (Na), aluminio (Al) y silicio (Si); mientras que para la muestra de MMT en su estado original, el Na está ausente. De esta manera se corrobora que el procedimiento empleado para intercalar Na⁺ en la estructura de la MMT fue efectivo.

Las muestras que contienen CHI en su estructura, evidenciaron la presencia de carbono (C), lo cual está asociado exclusivamente al polímero presente en la muestra analizada. Comparando la cantidad de C en cada una de las muestras de MMT/CHI y Na⁺MMT/CHI, observamos un 9% y un 15% de CHI, respectivamente. Este aumento en la cantidad de CHI, que forma parte del nanocompuesto obtenido con la Na⁺MMT, podría deberse a que los iones Na⁺ son fácilmente intercambiables con las cadenas poliméricas de CHI (Monvisade y col., 2009), favoreciendo así la interacción entre el polímero y la arcilla, aumentando de esta manera la proporción del polímero en el sistema.

De este modo, queda comprobado que la metodología empleada para obtener los diferentes sistemas nanoestructurados, fue efectiva.

Tabla 4.2: Composición elemental de las muestras analizadas por XRF.

| Compuesto | MMT (% masa) | Na ⁺ MMT (% masa) | MMT/CHI (% masa) | Na ⁺ MMT/CHI (% masa) |
|--------------------------------|-----------------|---------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| SiO ₂ | 77,9 | 71,3 | 69,5 | 63,6 |
| Al ₂ O ₃ | 14,2 | 13,4 | 14,3 | 14,9 |
| Fe ₂ O ₃ | 3,6 | 3,4 | 3,3 | 3,2 |
| K ₂ O | 2,1 | 1,9 | 1,8 | 1,6 |
| MgO | 1,3 | 1,9 | 1,5 | 1,1 |
| TiO ₂ | 0,7 | 0,8 | 0,6 | 0,6 |
| CaO | 0,2 | - | 0,1 | - |
| Br | 0,04 | - | 0,009 | - |
| ZrO ₂ | 0,04 | 0,04 | 0,02 | 0,03 |
| Na ₂ O | - | 7,2 | - | - |
| C | - | - | 8,9 | 15,0 |

4.4.4 Espectroscopía Infrarroja

Los fundamentos de esta técnica fueron mencionados anteriormente en la sección 2.2.4.2 del capítulo 2 de este trabajo de tesis.

Se compararon y examinaron los espectros FT-IR de los nanocompuestos y sus componentes puros para determinar posibles interacciones entre ellos.

El espectro de la Na⁺MMT (figura 4.3) presentó una banda de absorción ancha entre 3100 - 3700 cm⁻¹ debido a los grupos hidroxilos de la matriz de la arcilla y del agua adsorbida, y una banda de absorción intensa en el rango de 1000 – 1200 cm⁻¹ debido al estiramiento de los grupos silicatos Si-O-Si. También, se observó una banda característica a 1632 cm⁻¹ que se atribuyó a las moléculas de agua directamente coordinadas con los cationes intercambiables de la arcilla (Paluszkiewicz y col., 2011).

Por su parte, el espectro del CHI (figura 4.3) exhibió un pico asociado a la vibración de enlaces carbonilos de los grupos amida CONH-R a 1656 cm⁻¹ y un pico a 1587 cm⁻¹ correspondiente a las vibraciones de los grupos aminos (NH₂). Además, su espectro mostró una banda típica entre 3100 - 3700 cm⁻¹ correspondiente a los grupos -OH y -NH (Paluszkiewicz y col., 2011).

El FT-IR de la CLX (figura 4.3) mostró bandas características de este fármaco a 1640 cm⁻¹ correspondiente a la vibración de estiramiento de C=N-H, así como bandas de absorción correspondiente a los estiramientos aromáticos de C=C localizados a 1520 cm⁻¹ y 1400 cm⁻¹. Los picos a 2923 y 2864 cm⁻¹ se atribuyeron al estiramiento de los CH₂C-C de los grupos metilenos de la CLX. También, su espectro mostró una banda característica entre 3100 - 3700 cm⁻¹ correspondiente a los grupos -OH y -NH (Holešová y col., 2014).

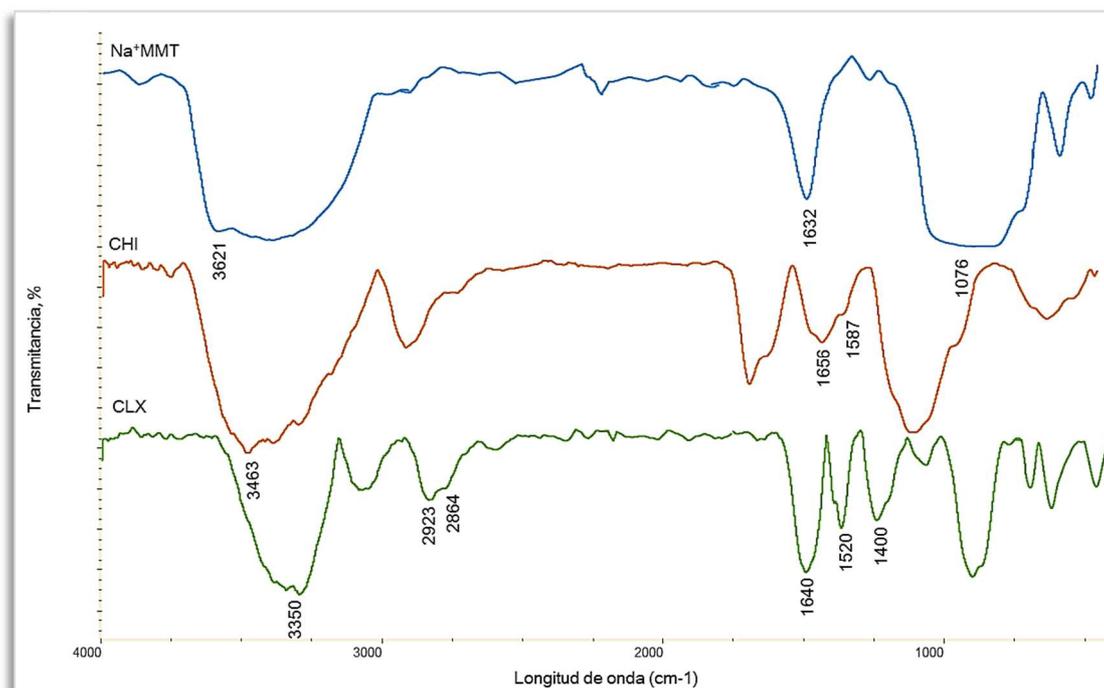


Figura 4.3: FT-IT de los compuestos puros: Na⁺MMT, CHI, CLX.

En el espectro FT-IR del nanocompuesto Na⁺MMT/CHI (figura 4.4), el pico del CHI correspondiente a los grupos -NH₂, que inicialmente estaba a 1587 cm⁻¹, tuvo un corrimiento a 1514 cm⁻¹, lo cual se asoció con la deformación vibracional del grupo amino protonado (-NH₃⁺) del CHI, indicando interacción electrostática entre el polímero catiónico y las cargas negativas de los grupos siálicos de la arcilla (Monvisade y col., 2009). Este resultado estuvo en concordancia con los obtenidos por otras técnicas, las cuales revelaron que el CHI efectivamente interacciona con la arcilla.

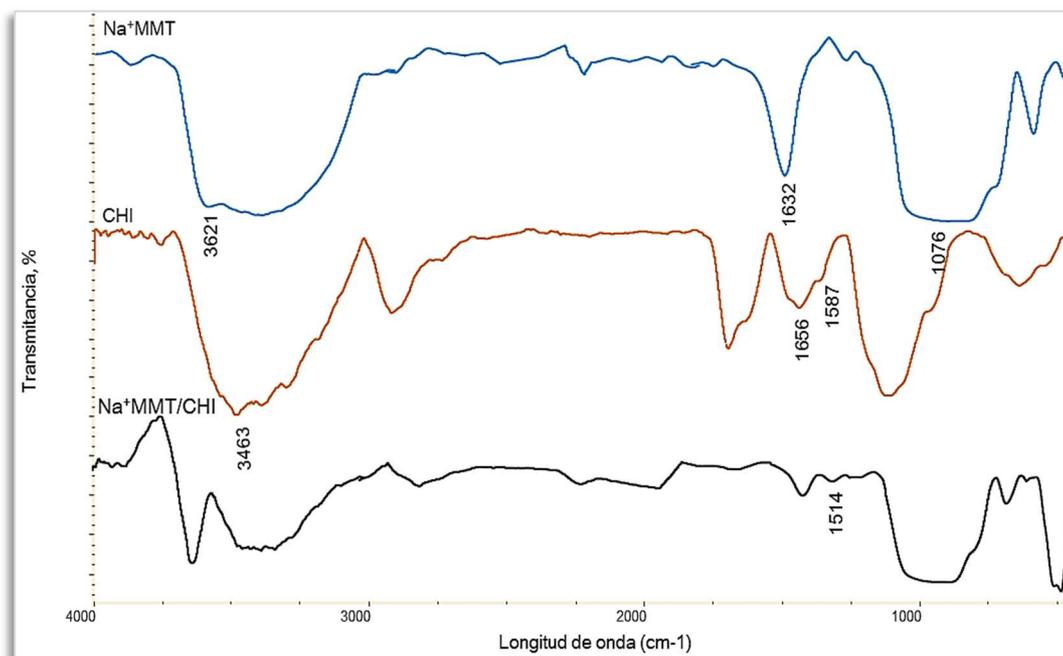


Figura 4.4: FT-IT de los compuestos puros y del sistema Na⁺MMT/CHI.

En el caso del nanocompuesto Na⁺MMT/CLX (figura 4.5), las bandas en la región de 3400 - 3200 cm⁻¹, fueron atribuidas al estiramiento asimétrico y simétrico de las bandas de los grupos -NH de la CLX, respectivamente. Una manera de corroborar que efectivamente ocurre la intercalación de un compuesto orgánico con la arcilla, es haciendo un análisis del efecto del agua intercambiable que ocurre en la región de los 1640 cm⁻¹. Debido a que la señal de C=N de la CLX pura también aparece en la zona de 1640 cm⁻¹, ambas señales se superponen, por lo cual la banda característica del agua estructural de la arcilla no se pudo observar claramente; y por lo tanto, no se pudo determinar exactamente la ubicación del fármaco en la estructura de la arcilla.

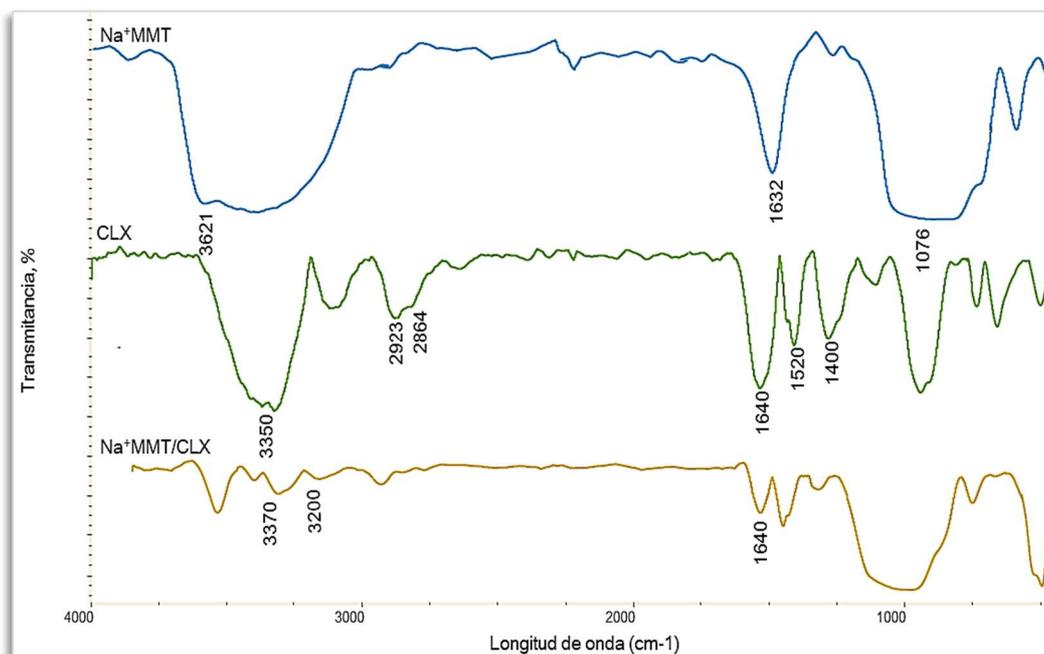


Figura 4.5: FT-IT de los compuestos puros y del sistema Na⁺MMT/CLX.

En la figura 4.6 se muestra el espectro FT-IR correspondiente al nanocompuesto Na⁺MMT/CHI/CLX. Se observó una banda alrededor de los 3626 cm⁻¹ debida al modo de estiramiento del grupo -OH de Al-OH, la banda en el rango de 1000 – 1200 cm⁻¹ se atribuyó al estiramiento Si-O-Si del grupo silicato. Las bandas en el rango de 3500 – 3300 cm⁻¹ fueron asignadas al estiramiento simétrico y asimétrico de las vibraciones de los grupos -NH, tanto de la CLX como del CHI; los picos a 2926 cm⁻¹ y 2862 cm⁻¹ se atribuyeron al estiramiento CH₂C-H de los grupos metilenos de la CLX. La vibración de estiramiento del grupo imina (C=N) de la CLX apareció a 1632 cm⁻¹, superpuesto al modo de flexión del agua adsorbida. Las bandas correspondientes a los anillos aromáticos de la CLX aparecieron en el rango de 1550 – 1300 cm⁻¹. La superposición de bandas de la CLX con las del CHI y de la MMT, impide una clara descripción de las interacciones entre los tres componentes en el sistema.

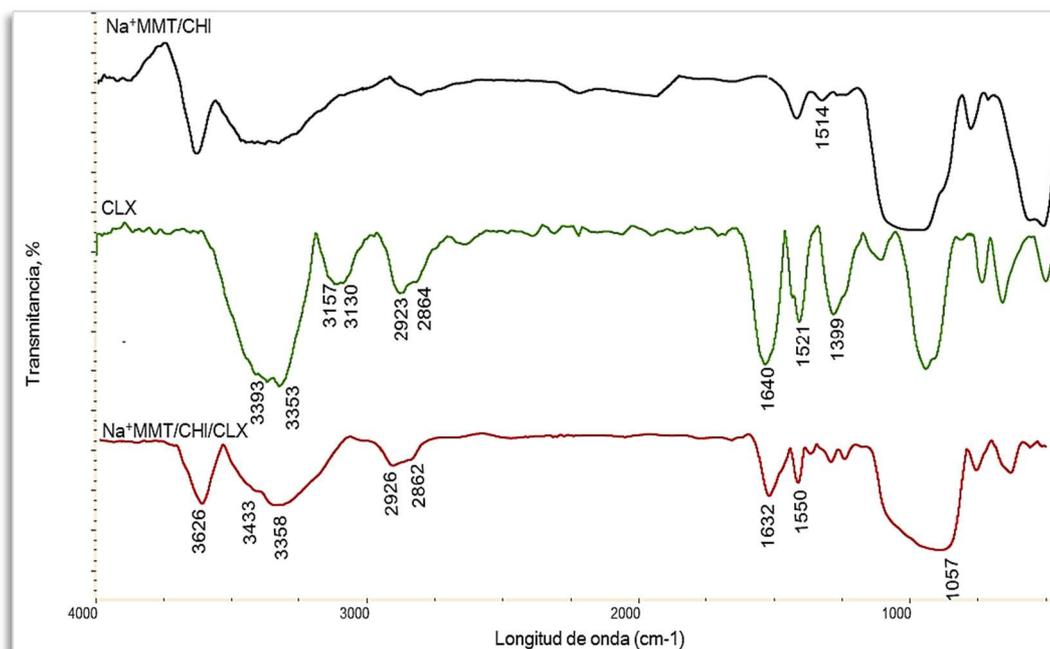


Figura 4.6: FT-IT de los compuestos puros y del sistema Na⁺MMT/CHI/CLX.

4.4.5 Espectroscopía de Rayos X

La espectroscopía de difracción de rayos X (XRD) es una técnica versátil y no destructiva, que proporciona información detallada de la composición química y estructural de los materiales estudiados. Las aplicaciones típicas de esta metodología incluyen la determinación de estructuras cristalinas, la evaluación de las estructuras de polimorfos y solvatos, la determinación del grado de cristalinidad y el estudio de transiciones de fase.

Con el objetivo de entender como el CHI interactúa con la arcilla mineral, se realizaron análisis de XRD para medir el espacio de separación entre las láminas (d) de la Na⁺MMT. Este valor d representa el espesor de la plaqueta de arcilla más la distancia interláminas (Celis y col., 2012). La figura 4.7 muestra los patrones de XRD de los nanocompuestos y de sus componentes puros.

El CHI muestra un patrón de XRD típico de un polvo de baja cristalinidad, con bandas de difracción alrededor de $2\theta \sim 10^\circ$, 20° y 40° . Estas reflexiones a bajas intensidades son debidas a las regiones cristalinas que se forman por los enlaces de hidrógeno, entre los grupos aminos e hidroxilos de las cadenas de CHI (Günister y col., 2007).

El patrón de difracción para la CLX es similar al del CHI, ya que también se trata de un polvo de baja cristalinidad, encontrándose una banda de difracción alrededor de $2\theta \sim 20^\circ$.

El difractograma de Na⁺MMT, presenta el espaciado basal esperado (d001) de 12,5 Å ($2\theta \sim 8,8^\circ$), consistente con la presencia de Na⁺ en las interláminas con una capa de hidratación (Hua y col., 2010).

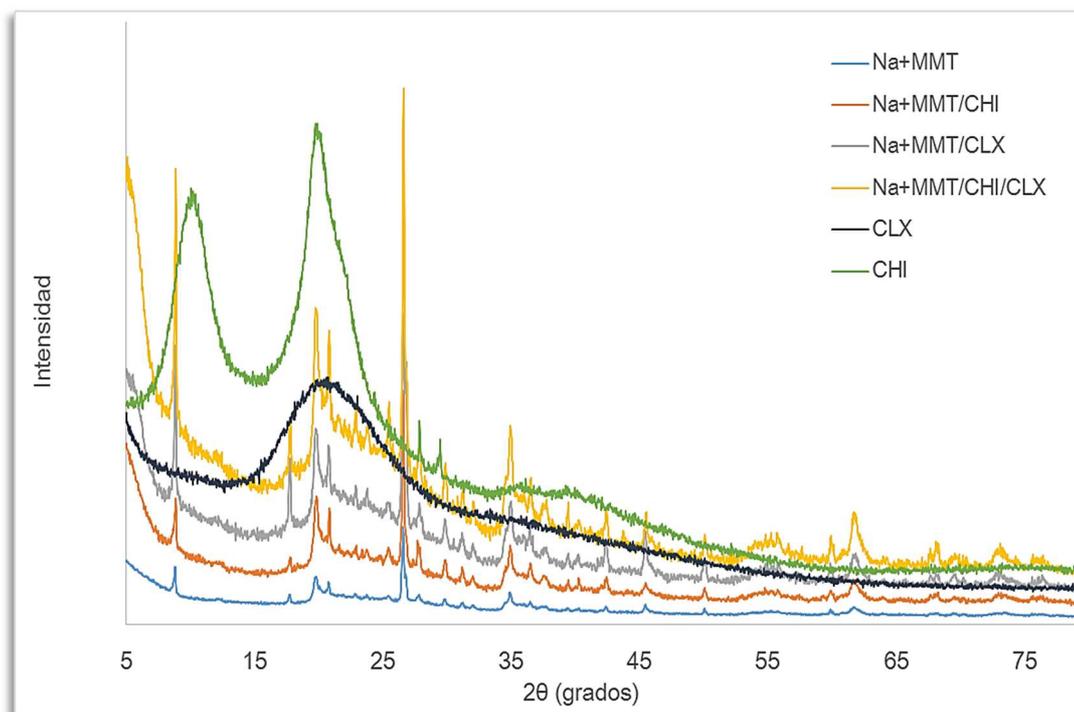


Figura 4.7: Patrón de difracción de rayos X.

En la figura 4.8, se muestran los difractogramas ampliados de los sistemas obtenidos y de la arcilla sódica, en el rango de $2\theta \sim 7^\circ$ a 11° , en donde se pueden observar claramente los corrimientos de la banda correspondiente a la arcilla, en el cual se basa la siguiente discusión de los resultados. Para el nanocompuesto Na⁺MMT/CHI, la difracción basal observada fue también $2\theta \sim 8,9^\circ$, aunque la banda de la arcilla se movió levemente hacia la derecha, lo cual indicaría que el CHI no ingresó lo suficiente al espacio interlaminar de la arcilla mineral, sino que el mismo estaría presente en la superficie de la misma (Günister y col., 2007). El patrón de XRD del sistema Na⁺MMT/CLX, mostró un patrón de difracción similar al de la arcilla sódica ($2\theta \sim 8,8^\circ$), aunque presenta un patrón de difracción menos

resuelto, comparado con el patrón de difracción de la Na⁺MMT; este resultado sugiere que la CLX también estaría adsorbida en la superficie de la arcilla. Resultados similares se observaron con el nanocompuesto Na⁺MMT/CHI/CLX, en donde el patrón de difracción exhibió una diferencia más marcada en cuanto al espaciado basal de la Na⁺MMT ($2\theta \sim 9^\circ$), ya que la banda de interés se desplazó hacia la derecha y se observaron picos más anchos.

Debido a que en todos los casos se mantuvo el pico característico del Na⁺MMT alrededor de $2\theta \sim 9^\circ$, estos resultados estarían indicando que las interláminas de la MMT permanecen ocupadas por los iones Na⁺ y no intercambiadas totalmente por el CHI, sino que el polímero se encontraría adsorbido en la superficie de la arcilla, debido a las fuertes interacciones que ocurren entre éste y la arcilla (Gao y col., 2014).

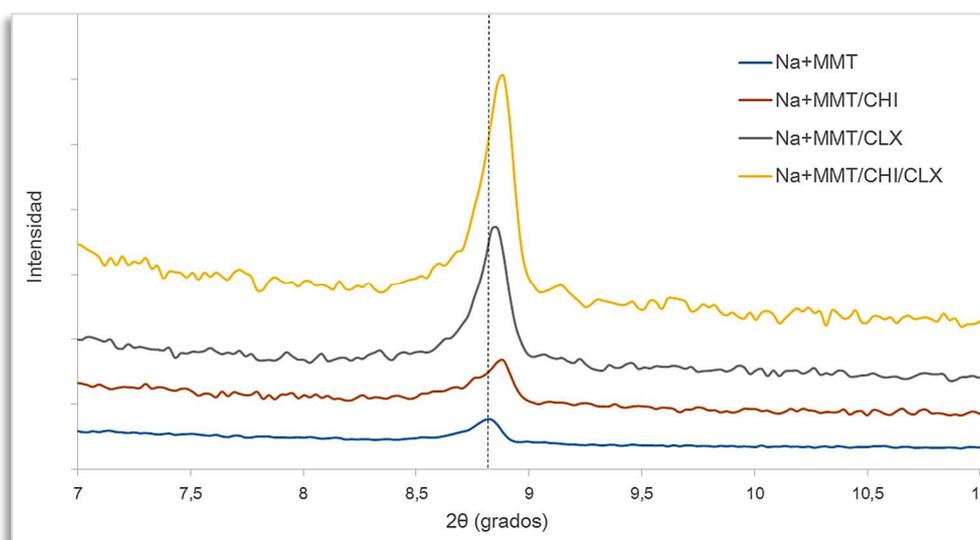


Figura 4.8: Patrón de difracción de rayos X ampliado

El resultado de este análisis de XRD sugiere que existen interacciones, fundamentalmente superficiales, entre los distintos componentes de las muestras analizadas, dando origen a los distintos nanocompuestos.

4.4.6 Análisis térmico: DSC/TGA

Los análisis térmicos se realizaron con el fin de determinar el comportamiento térmico de los diferentes sistemas sintetizados. Los fundamentos de esta técnica se presentaron con anterioridad, en la sección 2.2.4.1 del capítulo 2 de este trabajo de tesis.

Las curvas de DSC y TGA, correspondientes a CHI, se presentan en la figura 4.9, en donde se observaron tres procesos térmicos. El primer evento, con un máximo a 111 °C ocurrió con una pérdida de peso del 8,6 %, debido a la deshidratación del polímero, seguido de otros dos eventos, a 295 °C y a 524 °C, con una pérdida de peso del 59 y 33%, respectivamente, los cuales se atribuyeron a la descomposición seguida de la degradación del polímero (Oh y col., 2015).

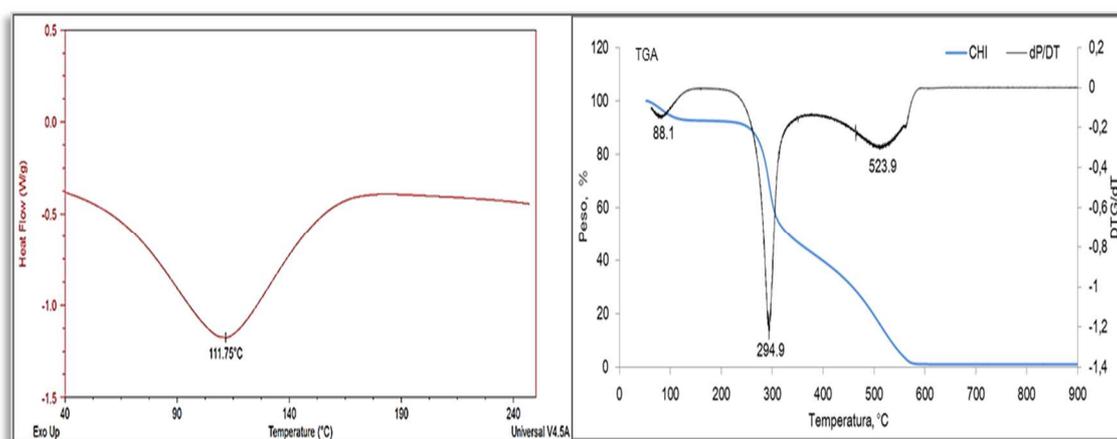


Figura 4.9: DSC y TGA de CHI

Con respecto a la Na⁺MMT (figura 4.10), se observó una pérdida de peso del 10% en el rango de temperaturas estudiado, lo cual se relacionó con la deshidratación del material. En las curvas de TGA, se observó que la máxima deshidratación de la arcilla ocurre aproximadamente a 90 °C, lo cual se atribuyó a la pérdida de moléculas de agua provenientes del agua adsorbida en la superficie de la Na⁺MMT. Posteriormente, la deshidratación continuó, pero sin presentar picos definidos en la curva de TGA, por lo cual se asoció a una deshidratación constante, probablemente debido a la pérdida de las moléculas

de agua coordinadas con los iones presentes en la arcilla (agua estructural) (Familiari y col., 2007).

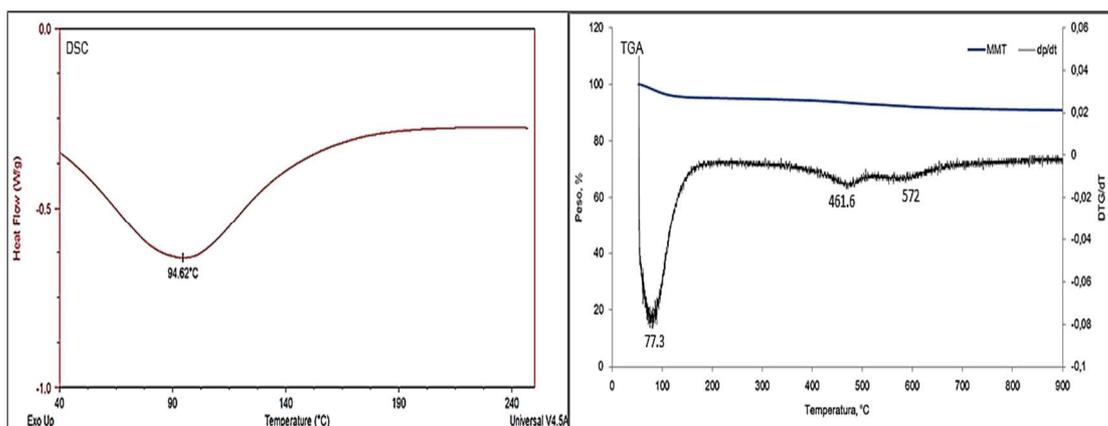


Figura 4.10: DSC y TGA de Na⁺MMT

La formación del nanocompuesto entre la Na⁺MMT y el CHI generó numerosos pasos de descomposición. Las curvas de DSC y TGA del sistema Na⁺MMT/CHI (figura 4.11) mostraron picos a 87, 240, 457 y 563 °C. El primer evento se asoció con la deshidratación del nanocompuesto, con un máximo a 87°C. Posteriormente, comenzaron los eventos de degradación y descomposición del polímero, con pérdida de peso máximo de 14%, mientras que el contenido de agua del nanocompuesto fue de 2%. Debido a que en estas condiciones experimentales el CHI se descompone totalmente y la Na⁺MMT es estable, se pudo determinar desde los termogramas de TGA que el contenido de CHI en el polvo del nanocompuesto fue de alrededor de 14%, resultado que coincidió con el obtenido por XRF.

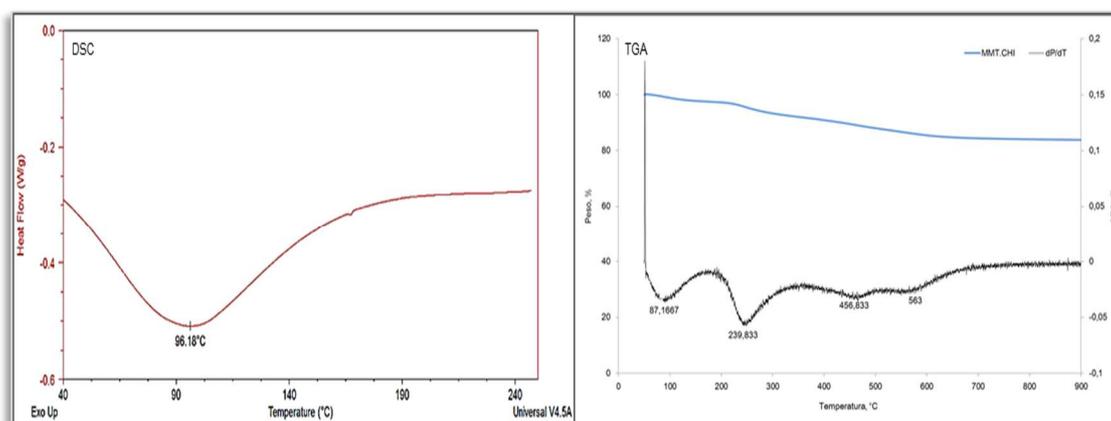


Figura 4.11: DSC y TGA del sistema Na⁺MMT/CHI

Por otro lado, las curvas de DSC/TGA del sistema Na⁺MMT/CLX (figura 4.12) presentó varios picos alrededor de 76, 183, 326 y 480 °C, y un hombro a 217 °C. Como ya se mencionó anteriormente, la arcilla es térmicamente estable, por lo cual la pérdida de peso observada se atribuyó a la evaporación y/o descomposición de la CLX incorporada en el sistema. La pérdida de peso ocurrida a alrededor de los 100 °C fue, de 2%, lo cual se asignó a la deshidratación del sistema; mientras que el hombro que se observó a 217 °C correspondió a la evaporación de la CLX adsorbida físicamente en la estructura de la arcilla. Los picos a 326 y 480 °C podrían deberse a la descomposición y degradación del fármaco que estaría intercalado en las láminas de la arcilla. La pérdida de peso observada fue de 40%.

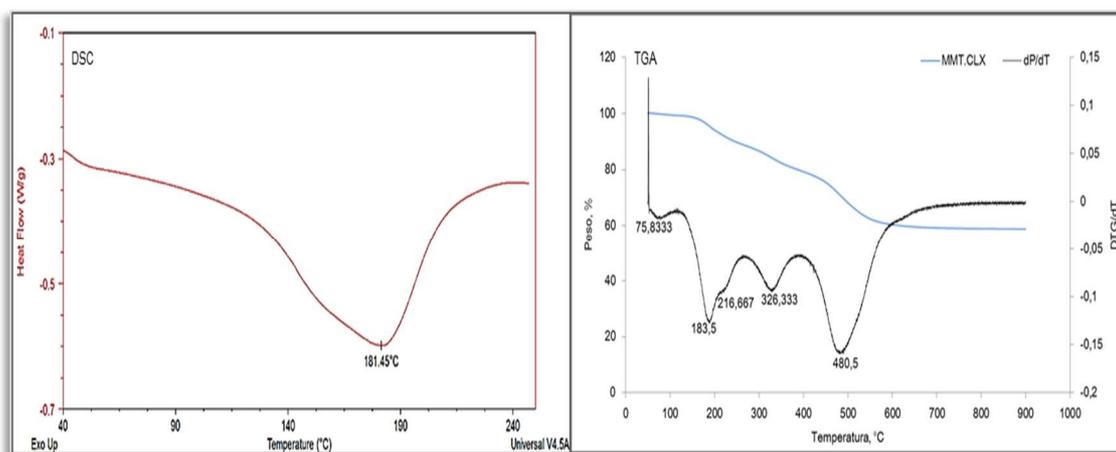


Figura 4.12: DSC y TGA del sistema Na⁺MMT/CLX.

El análisis térmico determinó que la pérdida de peso para el sistema Na⁺MMT/CHI/CLX fue del 48% (figura 4.13). La curva de TGA no presentó picos definidos, lo cual indica que la degradación y descomposición, tanto del CHI como de la CLX, en el nanocompuesto ocurrió gradualmente y a un ritmo uniforme. Este resultado sugiere una mayor estabilidad para los compuestos de origen orgánico que estarían interaccionando con la estructura de la arcilla mineral.

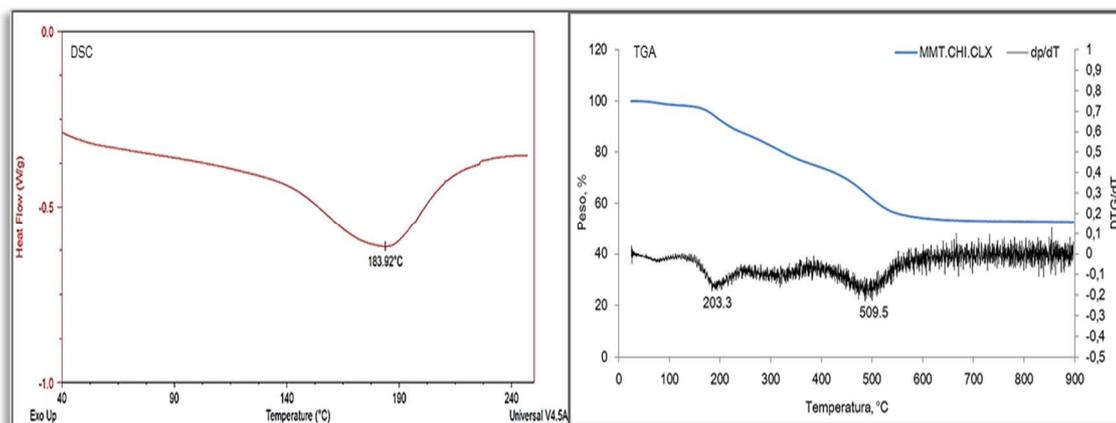


Figura 4.13: DSC y TGA del sistema $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CHI}/\text{CLX}$.

4.4.7 Microscopía Electrónica de Barrido

La técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM), fue descrita en la sección 3.1.3.5 del capítulo 3 de este trabajo de tesis. El SEM, en este caso, se utilizó con dos objetivos diferentes:

- Para conocer la superficie y morfología general de la Na^+MMT y del sistema $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CHI}$.
- Para realizar estudios de mucoadhesión con mucina gástrica porcina.

4.4.7.1 Morfología

En la figura 4.14, se muestra una imagen de SEM obtenida de una muestra de Na^+MMT , en donde se pudo identificar la estructura laminar de la arcilla y los bordes bien definidos de este material.

En el caso de la muestra de $\text{Na}^+\text{MMT}/\text{CHI}$, la imagen que se obtuvo por SEM (figura 4.15) es diferente con respecto a la imagen obtenida para la Na^+MMT . La diferencia fundamental es que no se pudo identificar la estructura laminar ni los bordes bien definidos observados en la imagen de la arcilla utilizada como referencia, ya que la Na^+MMT estaría recubierta uniformemente por el CHI.

Estas imágenes sugieren que el CHI interacciona efectivamente con la arcilla, dando origen de esta manera a un nanocompuesto híbrido orgánico-inorgánico, con una morfología diferente a las de sus materiales de origen.

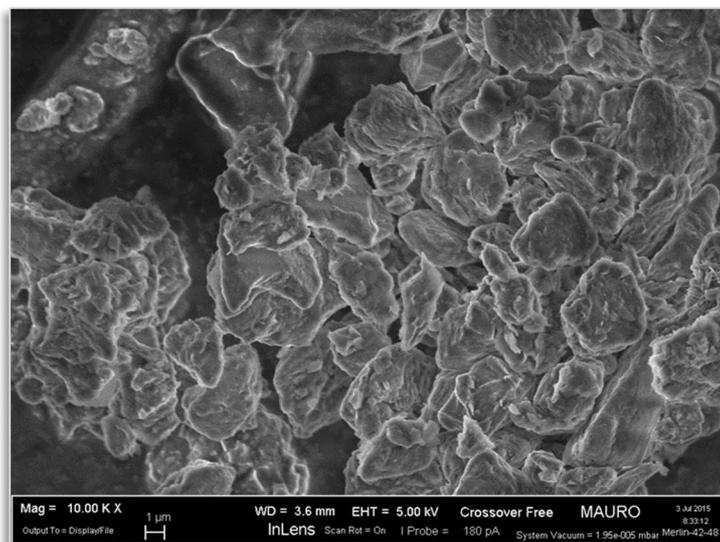


Figura 4.14: Imagen de SEM de la Na⁺MMT. Escala 1 μm, 10000x.

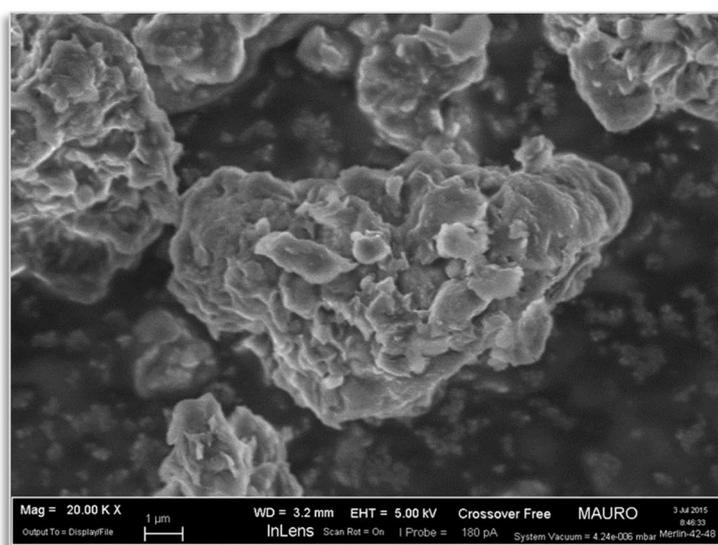


Figura 4.15: Imagen de SEM de Na⁺MMT/CHI. Escala 1 μm, 20000x.

4.4.7.2 Estudios de Mucoadhesión

Ha crecido la atención en el campo farmacéutico sobre el concepto de mucoadhesión, ya que provee la oportunidad de nuevas formas de dosificación, novedosas y altamente eficientes, para la administración bucal de los fármacos (Ayensu y col., 2012).

La mucina es el principal componente de la capa de mucus que recubre la mucosa de los órganos y superficies internas del cuerpo. La determinación de

las propiedades mucoadhesivas utilizando SEM, se basó en detectar cambios estructurales de la mucina, cuándo ésta se pone en contacto con compuestos mucoadhesivos.

Los ensayos de mucoadhesión tuvieron como objetivo determinar las interacciones adhesivas de la Na⁺MMT y del nanocompuesto Na⁺MMT/CHI/CLX con la MUC. La técnica utilizada en estos estudios y los fundamentos ya han sido descritos en la sección 3.2.3.1.2 del capítulo 3 de la presente tesis doctoral.

Se analizaron imágenes de la MUC, las cuales fueron utilizadas como blanco de referencia y de los sistemas MUC:Na⁺MMT y MUC:Na⁺MMT/CHI/CLX.

La imagen de la figura 4.16 corresponde a una muestra de mucina en donde se observó la estructura característica de esta glicoproteína. La mucina en su estado hidratado, tiene las fibras expandidas y ocupa todo el volumen en forma continua.

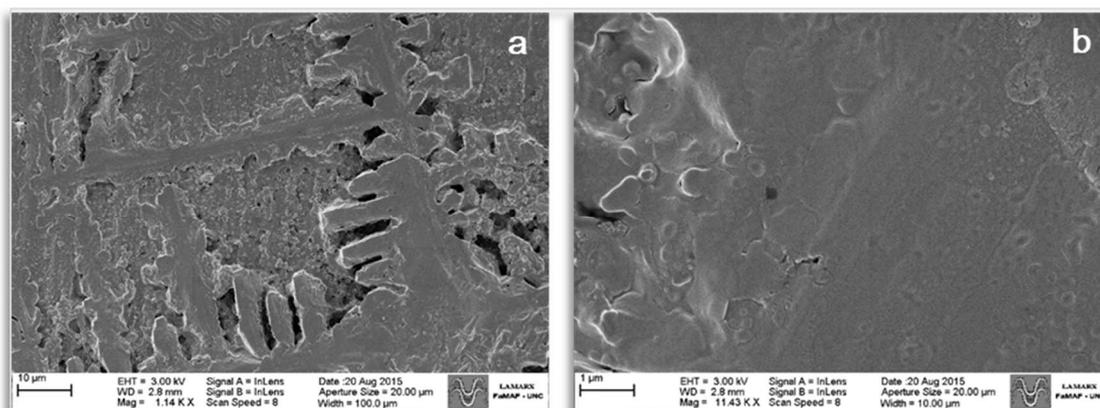


Figura 4.16: Mucina. a) Escala 10 μm , 1140x. b) Escala 1 μm , 11430x.

La imagen de la figura 4.17 fue tomada a una muestra de MUC con el agregado de Na⁺MMT; en la cual se pudo observar claramente que no se establecieron interacciones entre los compuestos, ya que se observa la presencia de cada componente en la muestra. Esto es debido a que al pH de trabajo (pH 7,4), ambos compuestos se encuentran cargados negativamente.

La MUC se adsorbió de manera globular sobre la superficie de la Na⁺MMT. Esta estructura esférica de la MUC es compatible con la agregación de ella.

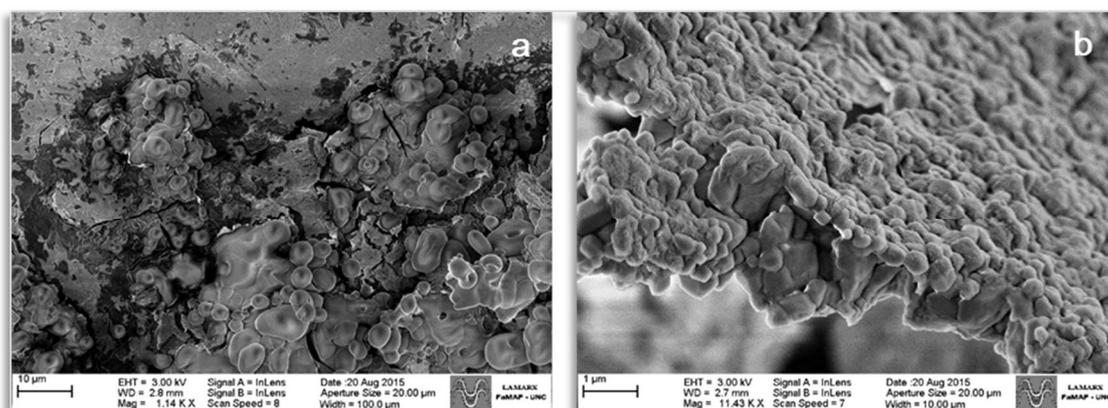


Figura 4.17: MUC:Na⁺MMT. a) Escala 10 µm, 1140x. b) Escala 1 µm, 11430x.

En las imágenes tomadas de la muestra de mucina en presencia del nanocompuesto Na⁺MMT/CHI/CLX, se observó una situación totalmente diferente a las observadas en las muestras anteriores. El agregado del nanocompuesto Na⁺MMT/CHI/CLX provocó cambios notables en la red de la mucina (figura 4.18). Las fibras parecen agregarse entre ellas, dejando huecos en la estructura. Esta agregación de las fibras probablemente sea debida a la deshidratación que sufre la MUC al interactuar con el CHI presente en el nanocompuesto.

Se sabe que el CHI posee propiedades mucoadhesivas, debido a la presencia de numerosos grupos aminos en las cadenas del polímero, que se encuentran protonados a pH fisiológico (Willits y col., 2001). Éstos forman enlaces de hidrógeno con las glicoproteínas del mucus y también interactúan iónicamente con los residuos de ácido siálico y con la carga negativa de la mucina (Albarkah y col., 2015; Silva y col., 2012).

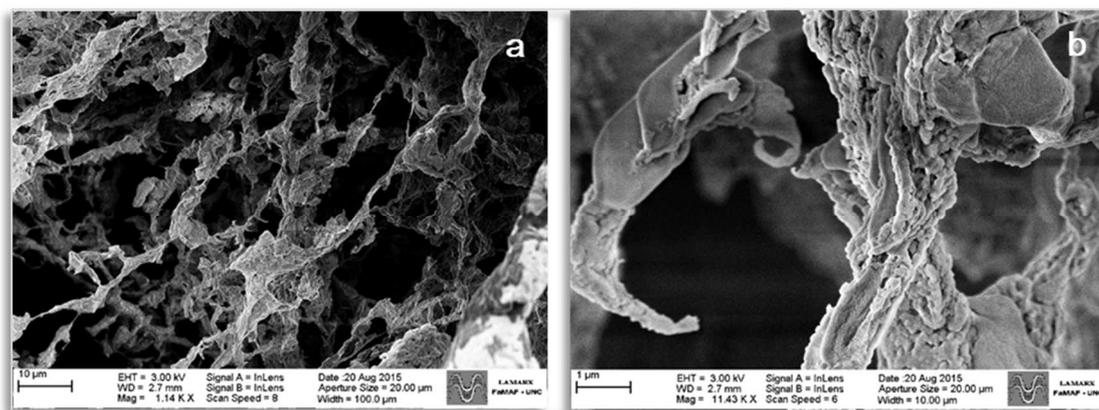


Figura 4.18: MUC:Na⁺MMT/CHI/CLX. a) Escala 10 μm , 1140x.
b) Escala 1 μm , 11430x.

En base a esta evidencia se puede decir que, efectivamente, existe una interacción entre el nanocompuesto y la mucina, la cual se establece debido a la presencia de CHI en la muestra, que es el responsable de conferir propiedades mucoadhesivas al sistema.

Aunque las condiciones utilizadas en este modelo son más simples que el típico entorno *in vivo*, el conocimiento resultante permite el diseño racional de materiales nanoestructurados basados en CHI para la entrega transmucosal específica de fármacos.

4.4.8 Estudios de Liberación *in vitro*

Los estudios de liberación *in vitro* se utilizan comúnmente para caracterizar la liberación de los fármacos desde sus sistemas de transporte. Para este fin, se realizaron los ensayos aplicando la técnica de diálisis en tubos con membranas de celulosa, con el objetivo de determinar la cinética de liberación.

Los estudios de liberación se llevaron a cabo con una membrana de celulosa con un tamaño de poro de 14 KDa para separar el compartimento donador, el cual contenía al sistema nanoparticulado cargado con el principio activo, del

compartimento receptor, el cual mantuvo las condiciones de sumidero² para el fármaco con respecto al compartimento donador.

Se cuantificó el principio activo, presente en las muestras tomadas de la solución del compartimento receptor, por espectroscopía UV-Vis, a $\lambda = 255$ nm. Los resultados obtenidos de los ensayos realizados se graficaron como el porcentaje de fármaco liberado (% Fco liberado) en función del tiempo (h), con el fin de obtener el perfil de liberación de CLX de cada sistema. A partir de dichos perfiles, se estimó la constante de liberación y el tipo de mecanismo involucrado en este proceso, utilizando la ecuación 4.4.

Para hacer una buena interpretación de los resultados se tuvo en cuenta que la aparición del fármaco en el compartimento receptor de la diálisis, es el resultado de la secuencia de dos pasos: primero, el fármaco se libera de la matriz nanoparticulada al medio de dispersión (compartimento donador) y, posteriormente, el principio activo atraviesa la membrana de diálisis. Asumiendo que el transporte del fármaco, desde el compartimento donador, está controlado por el primer paso, se puede asumir que no existe resistencia por la membrana al transporte del fármaco (Zambito y col., 2012). Para corroborar que realmente no existe dicha resistencia, se realizó el ensayo en las mismas condiciones experimentales con el fármaco puro.

² El término de **condición de sumidero** surge a partir de que la concentración de un fármaco a ambos lados de la capa epitelial de la pared intestinal, se aproxima al equilibrio en un breve lapso y que el TGI actúa como un sumidero natural; es decir, el fármaco es absorbido de manera inmediata cuando se solubiliza. Para simular esta condición de sumidero *in vivo*, las pruebas de liberación o disolución *in vitro* se llevan a cabo empleando un gran volumen de medio de disolución, o bien, reponiendo el volumen extraído en cada alícuota con medio fresco, de modo que la concentración del soluto nunca supera el 10 o 15 % de su solubilidad máxima.

Los ensayos de liberación se llevaron a cabo con la CLX y los sistemas Na⁺MMT/CLX y Na⁺MMT/CHI/CLX, en soluciones tamponadas de diferentes valores de pH: 1,2; 4,2 y 6,8, a temperatura ambiente, durante 24 h.

Los primeros ensayos se realizaron con la CLX pura, para conocer la liberación de referencia. Se pudo observar que la liberación de la CLX ocurrió rápidamente en las soluciones de pH 4,2 y 6,8, siendo más lenta la velocidad de liberación a pH 1,2. En todos los casos se liberó más del 80% del principio activo en las primeras 4 h. Los perfiles de liberación se presentan en el gráfico de la figura 4.19.

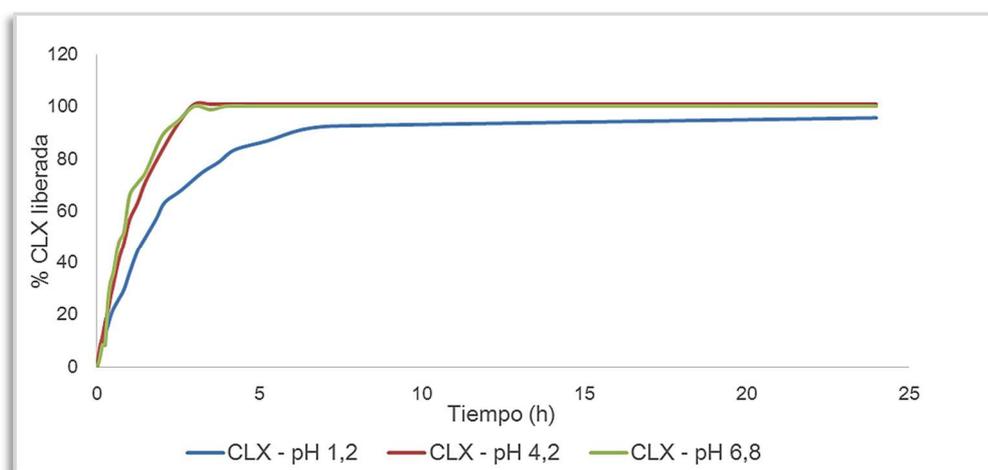


Figura 4.19: Perfiles de liberación de CLX a diferentes valores de pH.

Los porcentajes de fármaco liberado desde el nanocompuesto Na⁺MMT/CLX, luego de 24 h, a pH 1,2; 4,2 y 6,8 fueron del 22, 13 y 6%, respectivamente. Mientras que la liberación en este mismo período de tiempo desde el sistema Na⁺MMT/CHI/CLX a los mismos valores de pH fue del 32, 24 y 12%, respectivamente. Los perfiles de liberación se presentan en la figura 4.20. En ninguna de las dos formulaciones, se observó una descarga inicial rápida de CLX.

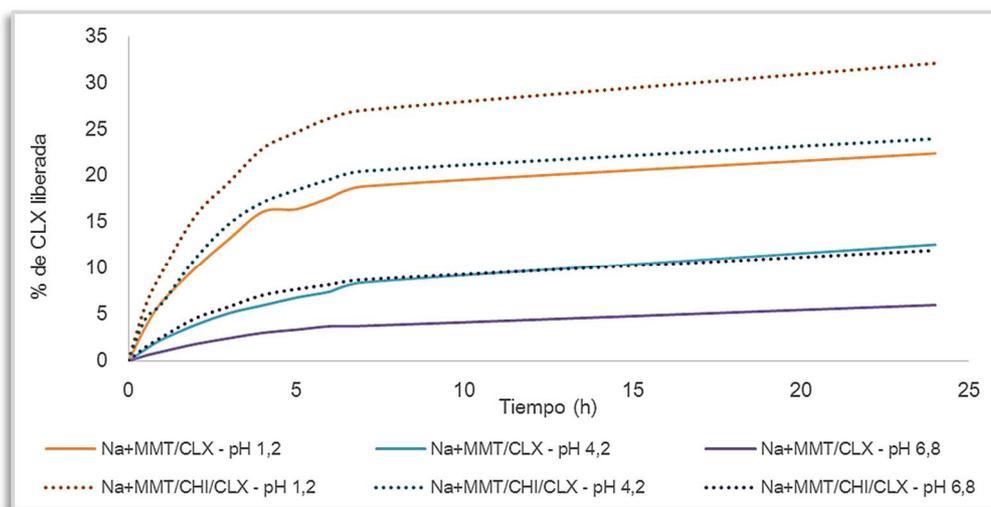


Figura 4.20: Perfiles de liberación de CLX desde Na⁺MMT y Na⁺MMT/CHI a diferentes valores de pH.

Los resultados sugieren que se obtuvo un sistema de liberación de fármacos modificado, ya que la velocidad de liberación del principio activo disminuye cuando se encuentra asociado a la Na⁺MMT o al sistema Na⁺MMT/CHI. Este comportamiento diferente, entre los dos nanocompuestos de CLX en comparación con la CLX sola, podría deberse a que las cargas positivas de la CLX interactúan fuertemente con las cargas negativas de la arcilla de ambos sistemas, Na⁺MMT y Na⁺MMT/CHI, haciendo la liberación del fármaco más lenta. Esta hipótesis tiene sus fundamentos en que en el rango de valores de pH estudiado, las cargas negativas de la arcilla aumentan a medida que aumenta el valor de pH, mientras que el fármaco se mantendría cargado positivamente ya que sus valores de pKa son 2,3 y 10,3.

A los tres valores de pH estudiados, se observó que la presencia del CHI en el nanocompuesto modifica la interacción entre el fármaco y la arcilla. Los perfiles de liberación evidenciaron que se liberó una mayor cantidad de CLX y a mayor velocidad, desde el nanocompuesto Na⁺MMT/CHI/CLX, comparado con el sistema Na⁺MMT/CLX.

El porcentaje acumulado de la liberación de fármaco, tuvo la siguiente secuencia, CLX > Na⁺MMT/CHI/CLX > Na⁺MMT/CLX, en todo el rango de pH estudiado. Los resultados se presentan en la tabla 4.3.

Tabla 4.3: Porcentajes acumulados de liberación de CLX.

| Muestras | pH | % CLX liberada (\pm DS) |
|-----------------------------|-----|----------------------------|
| CLX | 1,2 | 96 \pm 1 |
| | 4,1 | 100 \pm 2 |
| | 6,8 | 100 \pm 4 |
| Na ⁺ MMT/CLX | 1,2 | 24 \pm 1 |
| | 4,1 | 13 \pm 1 |
| | 6,8 | 6 \pm 1 |
| Na ⁺ MMT/CHI/CLX | 1,2 | 32 \pm 2 |
| | 4,1 | 24 \pm 1 |
| | 6,8 | 12 \pm 1 |

Se realizó un análisis estadístico con los datos obtenidos, para corroborar si efectivamente el porcentaje liberado de CLX es diferente con los distintos sistemas, Na⁺MMT/CLX y Na⁺MMT/CHI/CLX. Los resultados obtenidos de este análisis, indicó que los porcentajes de fármaco liberado son estadísticamente diferentes, a los distintos valores de pH estudiados (1,2; 4,2; 6,8), siendo el valor de p , para cada uno, de 0,0128; 0,0006 y 0,0007, respectivamente, cumpliéndose en todos los casos una $p < 0,05$.

El mecanismo de liberación de la CLX, desde los distintos sistemas, se estimó utilizando la ecuación de Korsmeyer-Peppas (ecuación 4.4), con la cual se pudo calcular el valor de la pendiente (n) y del coeficiente de correlación (r^2).

El valor de n es indicativo del tipo de mecanismo que gobierna la liberación, de acuerdo a lo siguiente (Jose y col., 2013):

- Menor a 0,5, se puede deber a la difusión parcial del fármaco a través de la matriz hinchada.
- Aproximadamente a 0,5, sugiere que se trata de un mecanismo controlado por una difusión pura (de Fick), es decir, que se basa solamente en la diferencia de concentración del fármaco adentro y afuera del compartimento donador.
- Entre 0,5 y 1, indica una cinética de transporte anómalo (no obedece a las leyes de Fick), es decir, que la difusión del fármaco a través de la matriz depende del hinchamiento de la misma y/o de la relajación de las cadenas poliméricas.

Los resultados obtenidos al aplicar la ecuación del modelo de liberación de Korsmeyer-Peppas, se presentan en la tabla 4.4.

Tabla 4.4: Modelo de liberación de Korsmeyer – Peppas.

| Muestras | pH | Ajuste Korsmeyer-Peppas | | |
|-----------------------------|-----|-------------------------|----------------|--------------------------------|
| | | N | r ² | Modelo |
| Na ⁺ MMT/CLX | 1,2 | 0,5828 | 0,979 | No obedece a las leyes de Fick |
| | 4,1 | 0,6532 | 0,9942 | |
| | 6,8 | 0,7365 | 0,9919 | |
| Na ⁺ MMT/CHI/CLX | 1,2 | 0,5679 | 0,984 | No obedece a las leyes de Fick |
| | 4,1 | 0,6518 | 0,972 | |
| | 6,8 | 0,664 | 0,9814 | |

Los valores de n calculados para los distintos sistemas, sugieren que el mecanismo de liberación del fármaco, desde ambos nanocompuestos Na⁺MMT/CHI/CLX y Na⁺MMT/CLX, no obedecen a las leyes de Fick, es decir, que la liberación se produce por medio de un mecanismo que depende del hinchamiento y la deformación de las cadenas de la matriz polimérica.

4.4.9 Estudios Microbiológicos *in vitro*

La técnica de difusión de discos en agar, es un método sencillo y flexible en cuanto a los antimicrobianos a estudiar, pero requiere de un riguroso control de todas sus variables para obtener resultados confiables. Está ideado para determinar la sensibilidad de microorganismos de crecimiento rápido y es aplicable a agentes antimicrobianos que difundan bien desde los discos, ya que de lo contrario, podrían estar dando como resultado falsas resistencias. Si la prueba de difusión con disco en agar está bien estandarizada, permite clasificar a los microorganismos en cuatro categorías, según los resultados obtenidos del diámetro de los halos de inhibición obtenidos: resistentes, intermedios, moderadamente sensibles y sensibles, y relacionarlos con la concentración mínima inhibitoria (Salamanca, 2012).

En la figura 4.21 se muestra una fotografía de las placas de Petri sembradas con *S. aureus* y los discos de difusión embebidos con las muestras a estudiar: CLX (como control), Na⁺MMT/CHI, Na⁺MMT/CHI/CLX y Na⁺MMT/CLX, en donde se observan claramente los halos de inhibición obtenidos.

Los ensayos microbiológicos se llevaron a cabo frente a 8 cepas diferentes de *S. aureus*, todos ellos por duplicado, encontrándose resultados similares con todas las cepas, los cuales se presentan en la tabla 4.5.

Se tomó como referencia el halo de inhibición de la CLX sola, la cual demuestra tener actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*. Al comparar los halos de inhibición de referencia, con los obtenidos con el sistema Na⁺MMT/CHI/CLX, se observó que éstos son estadísticamente similares entre sí ($p = 0,9$); mientras que el sistema Na⁺MMT/CLX demostró tener halos de inhibición estadísticamente mayores ($p = 0,005$), lo cual podría deberse a que el sistema binario tiene mayor cantidad de CLX asociado a él.

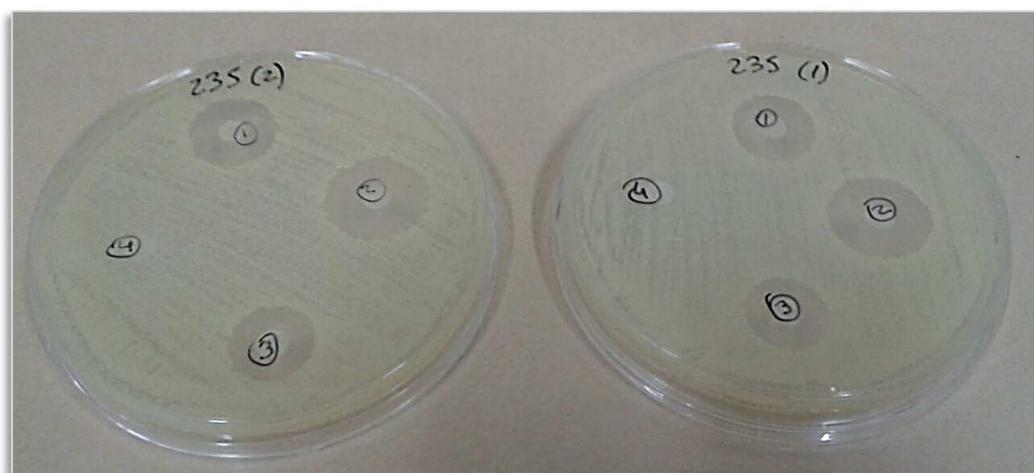


Figura 4.21: Imagen de los estudios en discos de difusión en agar.

Referencias: 1) CLX. 2) Na⁺MMT/CLX. 3) Na⁺MMT/CHI/CLX. 4) Na⁺MMT/CHI.

Tabla 4.5: Actividad antimicrobiana según el ensayo de difusión de discos.

| Cepa bacteriana | Zona de inhibición ± DS (mm) | | | |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| | CLX | Na ⁺ MMT/CLX | Na ⁺ MMT/CHI/CLX | Na ⁺ MMT/CHI |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | 1,2 ± 0,1 | 1,4 ± 0,1 | 1,2 ± 0,1 | No inhibición |
| <i>S. aureus</i> 235 | 1,8 ± 0,1 | 2,1 ± 0,1 | 1,6 ± 0,1 | No inhibición |
| <i>S. aureus</i> 787 | 1,8 ± 0,1 | 2,1 ± 0,1 | 1,6 ± 0,1 | No inhibición |
| <i>S. aureus</i> 2127 | 1,5 ± 0,1 | 2,0 ± 0,1 | 1,6 ± 0,1 | No inhibición |
| <i>S. aureus</i> 2804 | 1,5 ± 0,1 | 2,0 ± 0,1 | 1,6 ± 0,1 | No inhibición |
| <i>S. aureus</i> 123 | 1,5 ± 0,1 | 1,9 ± 0,1 | 1,6 ± 0,1 | No inhibición |
| <i>S. aureus</i> 43300 | 1,6 ± 0,1 | 2,5 ± 0,1 | 1,7 ± 0,1 | No inhibición |
| <i>S. aureus</i> 2387 | 1,9 ± 0,1 | 2,0 ± 0,1 | 1,8 ± 0,1 | No inhibición |

Este ensayo fue útil para demostrar que la CLX es capaz de difundir desde los bionanocompuestos obtenidos sin perder su actividad antimicrobiana, y, además, se corroboró que el sistema Na⁺MMT/CHI por sí mismo no tiene actividad antimicrobiana frente a las cepas ensayadas.

RESUMEN FINAL Y CONCLUSIONES GENERALES

Se obtuvieron nanocompuestos utilizando una metodología adaptada a la técnica descrita por Monvisade y col., combinando Na⁺MMT, CHI y CLX. Los sistemas obtenidos se caracterizaron fisicoquímicamente utilizando diversas técnicas como XRF, XRD, FT-IR y análisis térmico, las cuales evidenciaron la interacción de los componentes puros en las muestras obtenidas. La evidencia experimental sugiere que tanto el CHI como la CLX interaccionan superficialmente con la estructura de la Na⁺MMT.

La mucoadhesión tiene un rol importante en los sistemas de administración de fármacos, ya que plantea una forma de dosificación en el sitio de acción, proporcionando mayor tiempo de retención, mejorando la absorción del fármaco y logrando mayor biodisponibilidad. Las propiedades mucoadhesivas del sistema fueron conferidas por la presencia del CHI; lo cual se corroboró con estudios de mucoadhesión con MUC utilizando la técnica de SEM. Los resultados de estos estudios evidenciaron claramente, cómo se modificó la estructura de la MUC al ponerse en contacto con el CHI.

La eficiencia de carga de CLX en los sistemas fue de aproximadamente del 35 % para Na⁺MMT y 25 % para Na⁺MMT/CHI. Por medio de los estudios de liberación *in vitro* realizados se comprobó que los sistemas formulados con la arcilla, tienen la capacidad de retener al principio activo durante un período prolongado de tiempo, realizando una liberación controlada y sostenida del fármaco, sin una descarga abrupta inicial. La velocidad de liberación de la CLX, desde los diferentes sistemas, fue distinto a los tres valores de pH investigados, de acuerdo al siguiente orden CLX > Na⁺MMT/CHI/CLX > Na⁺MMT/CLX. Además, se demostró que el mecanismo de liberación del fármaco no obedece a las leyes de Fick, lo que significa que la liberación del principio activo depende

tanto del hinchamiento como de la relajación de las cadenas poliméricas del sistema.

Por su parte, los ensayos microbiológicos demostraron que la CLX fue capaz de difundir desde los nanocompuestos estudiados, sin perder su actividad antimicrobiana.

En base a todo lo expuesto, se concluye que se ha cumplido con el objetivo propuesto, el cual fue obtener un nanocompuesto híbrido orgánico-inorgánica de liberación controlado de fármacos para la administración bucal de CLX.

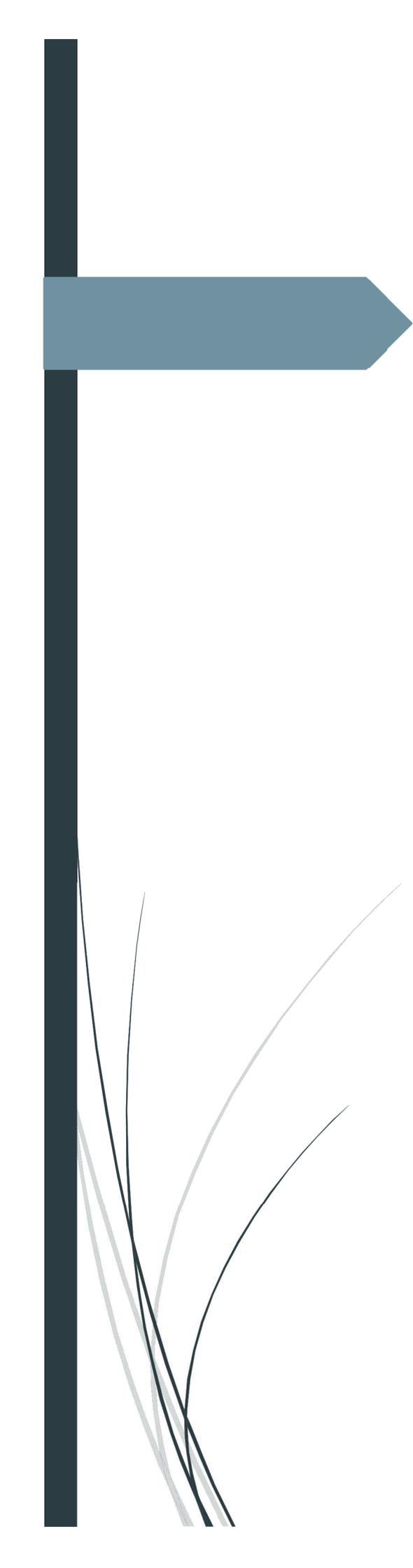
BIBLIOGRAFÍA (en orden alfabético)

- Aduba, D. C., Hammer, J. a., Yuan, Q., Andrew Yeudall, W., Bowlin, G. L., & Yang, H. (2013). Semi-interpenetrating network (sIPN) gelatin nanofiber scaffolds for oral mucosal drug delivery. *Acta Biomaterialia*, 9(5), 6576–6584.
- Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C., & Caramella, C. (2007). Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations. *Applied Clay Science*, 36(1-3), 22–36.
- Albarkah, Y. a., Green, R. J., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Probing the Mucoadhesive Interactions Between Porcine Gastric Mucin and Some Water-Soluble Polymers. *Macromolecular Bioscience*, n/a–n/a.
- Ayensu, I., Mitchell, J. C., & Boateng, J. S. (2012). In vitro characterisation of chitosan based xerogels for potential buccal delivery of proteins. *Carbohydrate Polymers*, 89(3), 935–941.
- Celis, R., Adelino, M. a, Hermosín, M. C., & Cornejo, J. (2012). Montmorillonite – chitosan bionanocomposites as adsorbents of the herbicide clopyralid in aqueous solution and soil / water suspensions. *Journal of Hazardous Materials*, 209-210, 67–76.
- Darder, M., Colilla, M., & Ruiz-Hitzky, E. (2003). Biopolymer-clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. *Chemistry of Materials*, 15(20), 3774–3780.
- Familiari, G., Relucenti, M., Familiari, a, Battaglione, E., Franchitto, G., & Heyn, R. (2007). Visualization of the real microarchitecture of glycoprotein matrices with scanning electron microscopy Conventional SEM analysis, 224–228.
- Gao, C., Zhang, M., Jiang, Z., Liao, J., Xie, X., Huang, T., ... Pan, F. (2014). Preparation of a highly water-selective membrane for dehydration of acetone by incorporating potassium montmorillonite to construct ionized water channel. *Chemical Engineering Science*, 135, 1–11.
- Günister, E., Pestreli, D., Ünlü, C. H., Atici, O., & Güngör, N. (2007). Synthesis and characterization of chitosan-MMT biocomposite systems. *Carbohydrate Polymers*, 67(3), 358–365.

- Holešová, S., Samlíková, M., Pazdziora, E., & Valášková, M. (2013). Antibacterial activity of organomontmorillonites and organovermiculites prepared using chlorhexidine diacetate. *Applied Clay Science*, *83-84*, 17–23.
- Holešová, S., Štembírek, J., Bartošová, L., Pražanová, G., Valášková, M., Samlíková, M., & Pazdziora, E. (2014). Antibacterial efficiency of vermiculite/chlorhexidine nanocomposites and results of the in vivo test of harmlessness of vermiculite. *Materials Science and Engineering C*, *42*, 466–473.
- Hua, S., Yang, H., Wang, W., & Wang, A. (2010). Controlled release of ofloxacin from chitosan-montmorillonite hydrogel. *Applied Clay Science*, *50*(1), 112–117.
- Huynh, T. T. N., Padois, K., Sonvico, F., Rossi, A., Zani, F., Piro, F., ... Falson, F. (2010). Characterization of a polyurethane-based controlled release system for local delivery of chlorhexidine diacetate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *74*(2), 255–264.
- Jose, S., Fanguero, J. F., Smitha, J., Cinu, T. a., Chacko, a. J., Premaletha, K., & Souto, E. B. (2013). Predictive modeling of insulin release profile from cross-linked chitosan microspheres. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *60*, 249–253.
- Joshi, G. V., Kevadiya, B. D., & Bajaj, H. C. (2010). Design and evaluation of controlled drug delivery system of buspirone using inorganic layered clay mineral. *Microporous and Mesoporous Materials*, *132*(3), 526–530.
- Knöfel, D. (1983). Química del Cemento. Calidad del cemento. In J. V. B. A. Carrete (Ed.), *Prontuario del cemento* (Editores t, pp. 145 – 235). Barcelona: Reverté S.A.
- Kolahi J, Mohamadrez A, Mohamad F, S. A. (2011). Chlorhexidine rinse for prevention of urethritis in men linked to oral sex. *Journal of Urology*, *185*(2), 538–539.
- Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. a. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, *15*(1), 25–35.
- Krauland, A. H., & Alonso, M. J. (2007). Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, *340*(1-2), 134–142.
- Marroquin, J. B., Rhee, K. Y., & Park, S. J. (2013). Chitosan nanocomposite films: Enhanced electrical conductivity, thermal stability, and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, *92*(2), 1783–1791.

- Monvisade, P., & Siriphannon, P. (2009). Chitosan intercalated montmorillonite: Preparation, characterization and cationic dye adsorption. *Applied Clay Science*, 42(3-4), 427–431.
- Nhung, D. T. T., Freydiere, A. M., Constant, H., Falson, F., & Pirot, F. (2007). Sustained antibacterial effect of a hand rub gel incorporating chlorhexidine-loaded nanocapsules (Nanochlorex®). *International Journal of Pharmaceutics*, 334(1-2), 166–172.
- Oh, S., Wilcox, M., Pearson, J. P., & Borrós, S. (2015). Optimal design for studying mucoadhesive polymers interaction with gastric mucin using a quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D): Comparison of two different mucin origins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (August), 1–7.
- Paluszkiewicz, C., Stodolak, E., Hasik, M., & Blazewicz, M. (2011). FT-IR study of montmorillonite-chitosan nanocomposite materials. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79(4), 784–788.
- Perioli, L., & Pagano, C. (2013). Preformulation studies of mucoadhesive tablets for carbamazepine sublingual administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102(i), 915–922.
- Rodriguez IC, Cerezo A, S. I. (2000). Sistemas de liberación Bioadhesivos - Bioadhesive delivery systems. *Ars Pharmaceutica*, 1(41), 115–128.
- Salamanca, U. de. (n.d.). Servidor educativo. Dpto de microbiología y genética.
- Sandri, G., Bonferoni, M. C., Ferrari, F., Rossi, S., Aguzzi, C., Mori, M., ... Caramella, C. (2014). Montmorillonite-chitosan-silver sulfadiazine nanocomposites for topical treatment of chronic skin lesions: In vitro biocompatibility, antibacterial efficacy and gap closure cell motility properties. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 970–977.
- Scholz, O. a., Wolff, A., Schumacher, A., Giannola, L. I., Campisi, G., Ciach, T., & Velten, T. (2008). Drug delivery from the oral cavity: focus on a novel mechatronic delivery device. *Drug Discovery Today*, 13(5-6), 247–253.
- Silva, C. a., Nobre, T. M., Pavinatto, F. J., & Oliveira, O. N. (2012). Interaction of chitosan and mucin in a biomembrane model environment. *Journal of Colloid and Interface Science*, 376(1), 289–295.

- Sudhakar, Y., Kuotsu, K., & Bandyopadhyay, a. K. (2006). Buccal bioadhesive drug delivery — A promising option for orally less efficient drugs. *Journal of Controlled Release*, 114(1), 15–40.
- Viseras, C., Cerezo, P., Sanchez, R., Salcedo, I., & Aguzzi, C. (2010). Current challenges in clay minerals for drug delivery. *Applied Clay Science*, 48(3), 291–295.
- Willits, R. K., & Saltzman, W. M. (2001). Synthetic polymers alter the structure of cervical mucus. *Biomaterials*, 22(5), 445–452.
- Xie, D. F., Martino, V. P., Sangwan, P., Way, C., Cash, G. a., Pollet, E., ... Avérous, L. (2013). Elaboration and properties of plasticised chitosan-based exfoliated nanobiocomposites. *Polymer (United Kingdom)*, 54(14), 3654–3662.
- Zambito, Y., Pedreschi, E., & Di Colo, G. (2012). Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems? - A case study. *International Journal of Pharmaceutics*, 434(1-2), 28–34.



Conclusiones y Proyecciones

Capítulo 5

Farm. Renée Onnainty
TESIS DOCTORAL

Capítulo 5:

CONCLUSIONES y PROYECCIONES

CONCLUSIONES

El objetivo principal planteado en esta tesis doctoral fue “*Mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos a través de la obtención de nuevos sistemas de liberación nanoparticulados que combinen quitosano y ciclodextrinas; y quitosano con arcillas minerales*”; trabajando en ambos casos con fármacos modelos.

La hidroclorotiazida (HCT) es un fármaco de baja solubilidad y baja permeabilidad intestinal, por lo tanto pertenece a la clase 4 del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico. Existen numerosas estrategias para mejorar estas características desfavorables; una de ellas es la utilización de ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas (CD), tienen una cavidad hidrofóbica, capaz de albergar en su interior una molécula poco soluble en agua. Particularmente en este trabajo de tesis, se utilizó la β CD ya que es la más conveniente en cuanto al tamaño, propiedades y costo. El complejo formado, entre la HCT y la β CD, fue ampliamente caracterizado, realizándose estudios en estado líquido, sólido y cálculos teóricos.

En estado líquido se realizaron DSF, ITC y ^1H RMN. Estas técnicas evidenciaron la formación de un complejo de inclusión de estequiometría 1:1 entre la HCT y la β CD. Tanto los DSF como la ITC, demostraron que se formó un complejo débil ya que las constantes de estabilidad fueron pequeñas y que a su vez, éstas disminuyeron a medida que aumentaba la temperatura y el grado de ionización de la HCT. Por medio de los análisis de espectros de ^1H RMN de la HCT y de la β CD, tanto libres como acomplejadas, a 25 y 45 °C, se pudo establecer el tipo de interacción que ocurre entre el fármaco y la β CD; observándose que la HCT ingresa completamente en la cavidad de la β CD.

En estado sólido, se llevó a cabo la caracterización por medio de análisis térmico (DSC/TGA), FT-IR y ensayos de disolución. Tanto el análisis térmico como el FT-IR, demostraron la formación de una nueva especie química ya que las curvas y espectros de absorción obtenidos, respectivamente, fueron diferentes a los correspondientes de los componentes puros. Por medio de los ensayos de disolución, se pudo determinar que la velocidad de disolución de la HCT fue significativamente mayor en comparación a la obtenida con la HCT pura, lo cual indicó, que por medio de la estrategia utilizada, se logró mejorar unas de las características biofarmacéuticas desfavorables del fármaco en estudio.

Estos estudios experimentales, fueron complementados con estudios teóricos. Los estudios de modelado molecular se llevaron a cabo por medio de *docking* molecular y dinámica molecular. Se obtuvo una muy buena correlación entre los resultados teóricos y los experimentales.

En una segunda etapa dentro del desarrollo de esta tesis doctoral, se planteó el objetivo de obtener un sistema nanoparticulado capaz de encapsular y controlar la liberación del complejo de inclusión HCT/ β CD obtenido previamente. Para lo cual, se desarrollaron NPs poliméricas, con quitosano (CHI) y tripolifosfato de sodio, utilizando la técnica de gelación iónica. Las nanopartículas obtenidas, fueron ampliamente caracterizadas, encontrándose que las mismas tienen un tamaño promedio de 350 nm, con una morfología esférica y de superficie lisa. Las NPs obtenidas, fueron capaces de encapsular una cantidad equivalente a (350 ± 130) μ g de HCT acomplejada con la β CD.

Se realizó una evaluación biofarmacéutica del sistema nanoparticulado obtenido. Las propiedades mucoadhesivas de las NPs se determinaron con el método de la mucina, tanto por DLS como por SEM. Ambas técnicas demostraron que las NPs interactúan con la mucina, probablemente debido a interacciones electrostáticas, corroborando de esta manera las propiedades bioadhesivas del sistema nanoparticulado.

Se llevaron a cabo estudios de permeabilidad *in vitro*, utilizando la técnica de saco intestinal evertido de ratas. Estos estudios se llevaron a cabo con la HCT sola en diferentes cantidades iniciales y con las NPs cargadas con el complejo HCT/ β CD. Los resultados indicaron que la HCT se libera lenta y sostenidamente

desde el sistema nanoparticulado, quedando disponible para la absorción pequeñas cantidades de fármaco, si se lo compara con los estudios realizados con soluciones del fármaco solo en distintas cantidades iniciales.

Los segmentos intestinales utilizados en los ensayos de permeabilidad, se utilizaron para realizar estudios a nivel histológicos, utilizando MOAR y TEM. Las imágenes obtenidas de los tejidos intestinales, evidenciaron un gran daño a nivel epitelial causado por la HCT, en donde se observó la desaparición del epitelio que recubre el intestino. Mientras que, en las imágenes obtenidas de los tejidos tratados con las NPs cargadas con el complejo de inclusión, se encontró que este daño fue menor, encontrándose zonas en donde el epitelio del intestino se mantuvo intacto y en otras en donde se veía dañado, a causa de la presencia del fármaco. Este retardo en el daño del epitelio se atribuyó, a la lenta liberación del principio activo desde las NPs.

Como tercera y última etapa para cumplimentar con los objetivos planteados en este trabajo de tesis, se obtuvieron nanocompuestos utilizando una adaptación de la técnica descrita por Monvisade y col., combinando montmorillonita (MMT) y CHI. El nanocompuesto fue evaluado como sistema de liberación de fármacos, utilizando la clorhexidina (CLX), como fármaco modelo.

La CLX es un antiséptico local ampliamente utilizado en la actualidad en odontología para el tratamiento de la gingivitis y como antiplaquetario. Se lo utilizó como fármaco modelo, ya que este sistema de liberación fue planteado para utilizarse en la cavidad oral.

Los sistemas obtenidos se caracterizaron fisicoquímicamente utilizando diversas técnicas como XRF, XRD, FT-IR y análisis térmico; las cuales evidenciaron la interacción de los componentes puros en las muestras obtenidas. Se determinó que tanto el CHI como la CLX interaccionan superficialmente con la estructura de la Na⁺MMT.

El CHI, le confirió propiedades mucoadhesivas al sistema; las cuales se corroboraron realizando estudios de mucoadhesión con mucina gástrica porcina

utilizando la técnica de SEM. Los resultados de estos estudios evidenciaron claramente, como se modificó la estructura de la mucina al estar en contacto con el CHI.

La eficiencia de carga de CLX en los sistemas fue de aproximadamente 35% para Na⁺MMT y 25% para Na⁺MMT/CHI. Por medio de los estudios de liberación *in vitro* realizados, se comprobó que los sistemas Na⁺MMT/CLX y Na⁺MMT/CHI/CLX tiene la capacidad de retener al principio activo durante un período prolongado de tiempo, realizando una liberación controlada y sostenida del fármaco, sin una descarga abrupta inicial. La velocidad de liberación de la CLX desde los sistemas, fue diferente a los tres valores de pH investigados, respetando en todos los casos, el orden CLX > Na⁺MMT/CHI/CLX > Na⁺MMT/CLX. Además se demostró que el mecanismo de liberación del fármaco no obedece a las leyes de Fick, lo cual significa que la liberación del principio activo depende tanto del hinchamiento como de la relajación de las cadenas poliméricas del sistema.

Además se realizaron ensayos microbiológicos, los cuales demostraron que la CLX fue capaz de difundir desde los sistemas nanocompuestos, sin perder su actividad antimicrobiana.

Como conclusión final de este trabajo de tesis, se puede decir que se logró cumplir el objetivo principal, ya que:

- ✓ Se obtuvo un complejo de inclusión entre la HCT y la β-CD con una estequiometría 1:1, capaz de aumentar la solubilidad y la velocidad de disolución de la HCT.
- ✓ Se desarrollaron dos sistemas de liberación controlada de fármacos:

- Nanopartículas poliméricas con un tamaño adecuado para encapsular principios activos, con propiedades mucoadhesivas, capaces de actuar como un sistema de reservorio y de liberación controlada de fármacos.
- Bionanocompuestos combinando CHI y MMT, para la administración bucal de fármacos.

PROYECCIONES

Las proyecciones que surgen, están relacionadas a las nanopartículas poliméricas y están orientadas a:

- ✓ Realizar estudios de liberación *in vitro* colocando mucina en el medio, tanto donador como receptor.

Los estudios de mucoadhesión realizados con mucina, evidenciaron que los agregados que se formaban a pH 7,4 se rompieron en presencia de la mucina, por lo tanto se supone que el fármaco se libera al medio. Debido a esto, se propone colocar mucina en las soluciones tamponadas que se utilicen como medio donador y receptor, con el fin de dilucidar si la mucina es la responsable de desestabilizar las NPs permitiendo la liberación del fármaco, y así determinar la cinética de liberación de la HCT desde las nanopartículas.

- ✓ Profundizar en los estudios de permeabilidad intestinal y toxicidad intestinal de HCT.

Para lo cual se planea realizar ensayos de permeabilidad utilizando la misma técnica *in vitro*, con HCT, con las NPs cargadas con el complejo y con NPs vacías. Los objetivos de este ensayo son evaluar la capacidad protectora que tienen las NPs hacia el tejido intestinal y relacionar la influencia que tiene el daño epitelial en la velocidad de absorción y en el coeficiente de P_{app} . La metodología consistiría en tomar muestras de los tejidos a diferentes tiempos, observar los daños en el tejido por MOAR y TEM. Posteriormente, correlacionar el daño observado los tejidos con el coeficiente de P_{app} y velocidad de absorción del principio activo.



Anexo



Farm. Renée Onnainty
TESIS DOCTORAL

TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS INTERNACIONALES

Durante el desarrollo de la tesis, se publicaron los siguientes trabajos científicos:

- María J. Mora, Luis I. Tártara, Renée Onnainty, Santiago D. Palma, Marcela R. Longhi, Gladys E. Granero. Characterization, dissolution and in vivo evaluation of solid acetazolamide complexes. Carbohydrate Polymers. Volumen 98. Páginas 380 -390. Junio 2013.

- Renée Onnainty, Esteban M. Schenfeld, Mario A. Quevedo, Mariana A. Fernández, Marcela R. Longhi, Gladys E. Granero. Characterization of the Hydrochlorothiazide:β-Cyclodextrin Inclusion Complex. Experimental and Theoretical Methods. The Journal of Physical Chemistry B. Volumen 117. Páginas: 206-217. Diciembre 2012.

- Renée Onnainty, Marcela R. Longhi, Gladys E. Granero. Investigation of the Aggregation State of Chlorhexidine Gluconate in the Presence and Absence of Hidroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD) by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (1H-NMR). Carbohydrate Research. Volumen 346, Tema 8. Páginas: 1037-1046. Marzo 2011.

